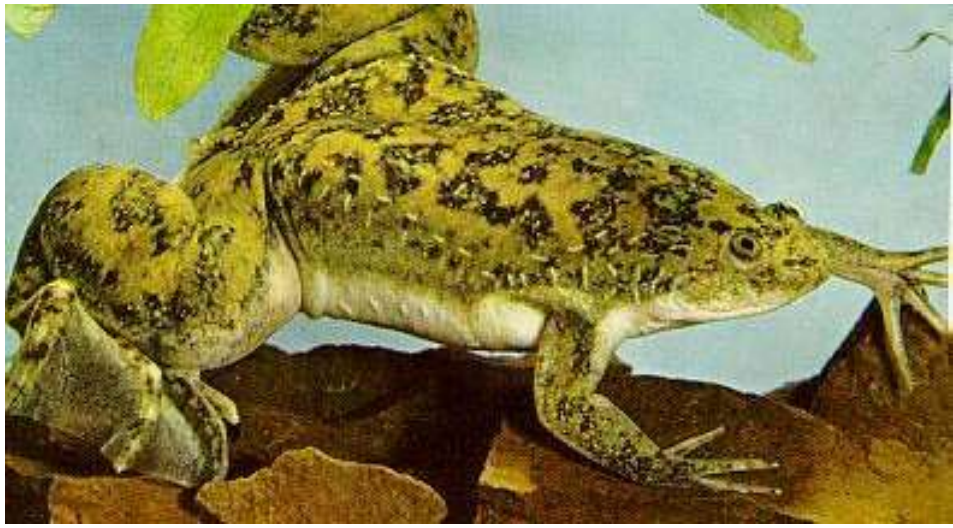
Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

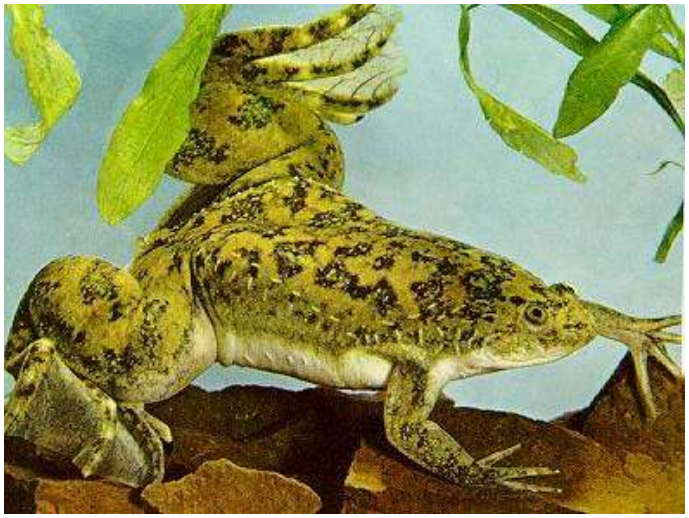
Fachbereich biologie
Institut für pflanzenwissenschaften
und mikrobiologie



Entwicklungsbiologie
Sommersemester 2020

Vertebraten I: Amphibien und Huhn

Modelsystem: *Xenopus laevis*



- Afrikanischer Krallenfrosch Xenopus laevis (im Labor zu züchten)
- Geschlechtsreife in 14 Wochen, erreicht bis zu 8 cm Länge
- Heteromorphe ZW/ZZ-Geschlechtschromosonen : ZZ = ♂, ZW = ♀

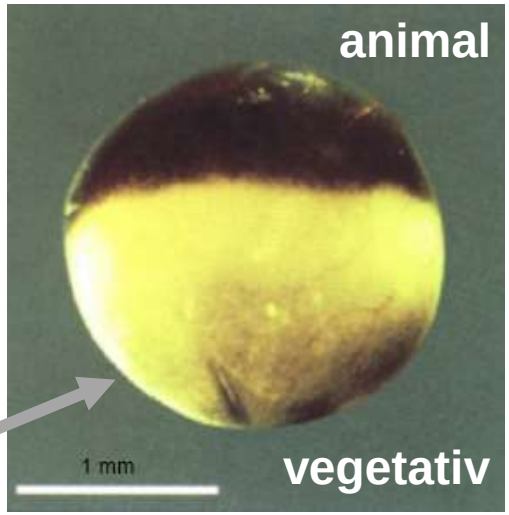
Vorteile

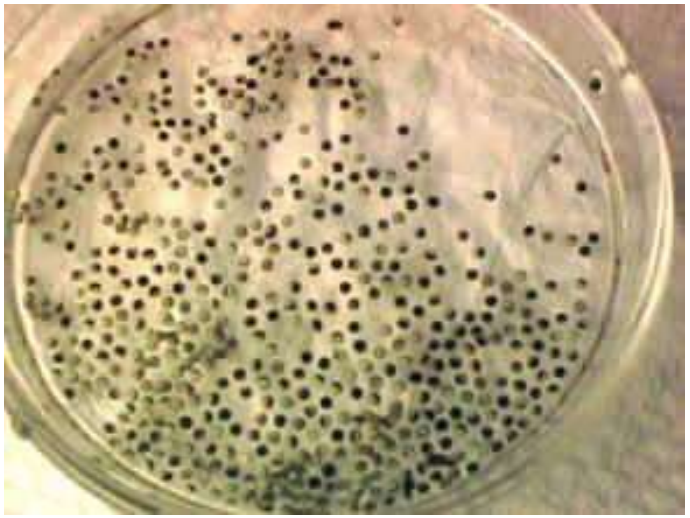
- Induzierbare Ablaichen durch Progesteron Injektion
- Eier und Embryonen sind relativ groß und sehr stabil
- Lässt sich in Leitungswasser halten
- Möglichkeit der *in vitro-Befruchtung*

Nachteile

- *X. laevis* tetraploid (36 Chromosomen), *X. tropicalis* diploid (20 Chromosomen)

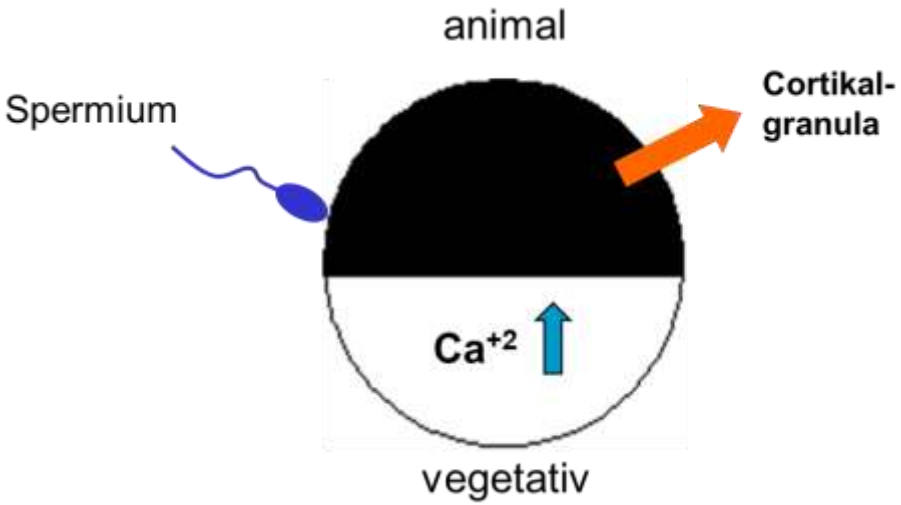
Modelsystem: *Xenopus laevis*





- Eigröße ~2 mm
- A/V-Achse (maternal festgelegt); animaler Pol pigmentiert (Melanine)
- Ei mesolecithal (= mittlerer Dottergehalt) + telolecithal (= Dotter am vegetativen Pol konzentriert)
- Die Furchung erfolgt daher inäqual und radiär.

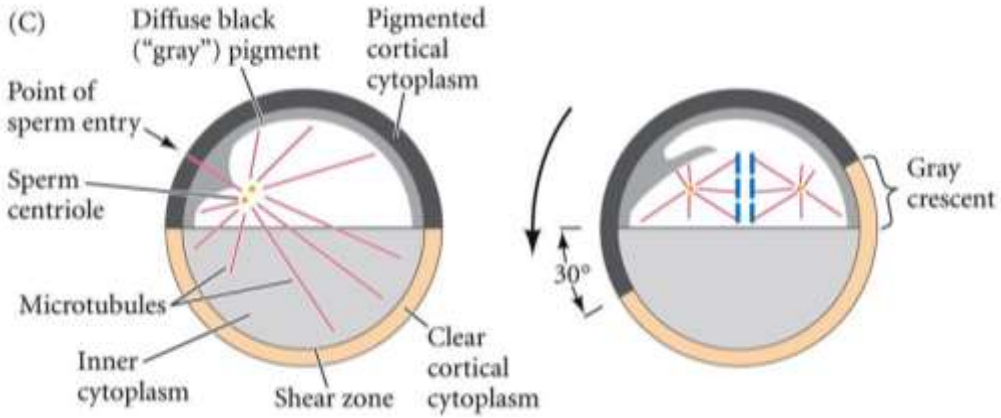
Befruchtung des Xenopus-Eis

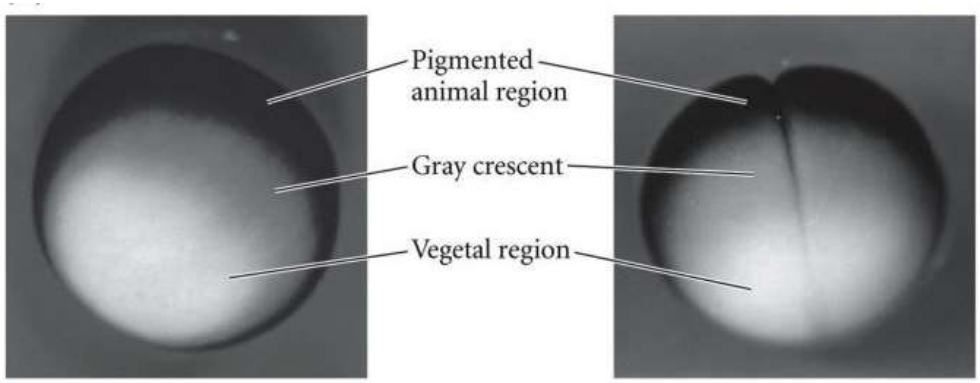


- Oocyte befindet sich bei Befruchtung in Metaphase II der Meiose
- Spermium kann nur am animalen Pol binden

- Befruchtung:
  - Depolarisation => Ca^{2+} wird aus endoplasmatischen Retikulum entlassen
    => Freisetzung der Cortikalgranula
    => Befruchtungsmembran
    => Verhinderung der Polyspermie

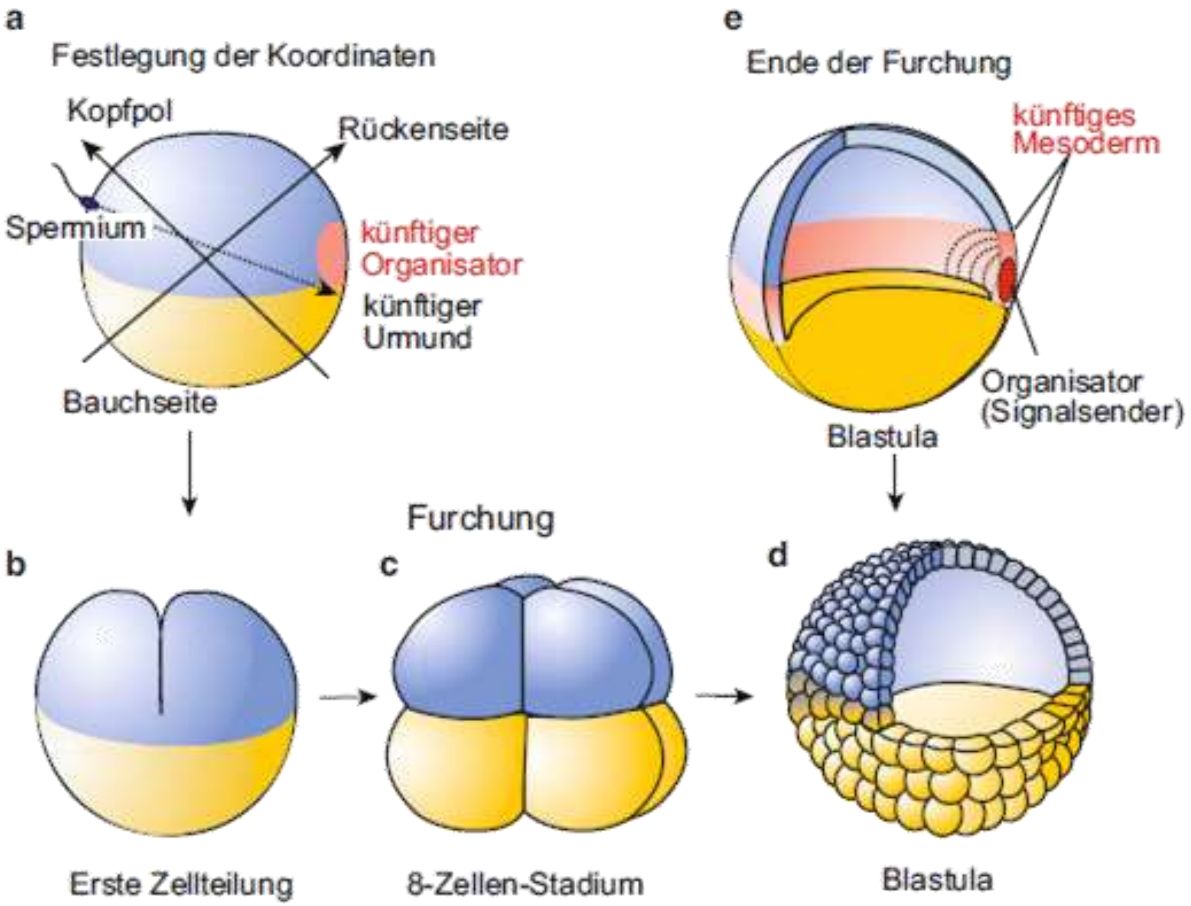
Befruchtung des Xenopus-Eis





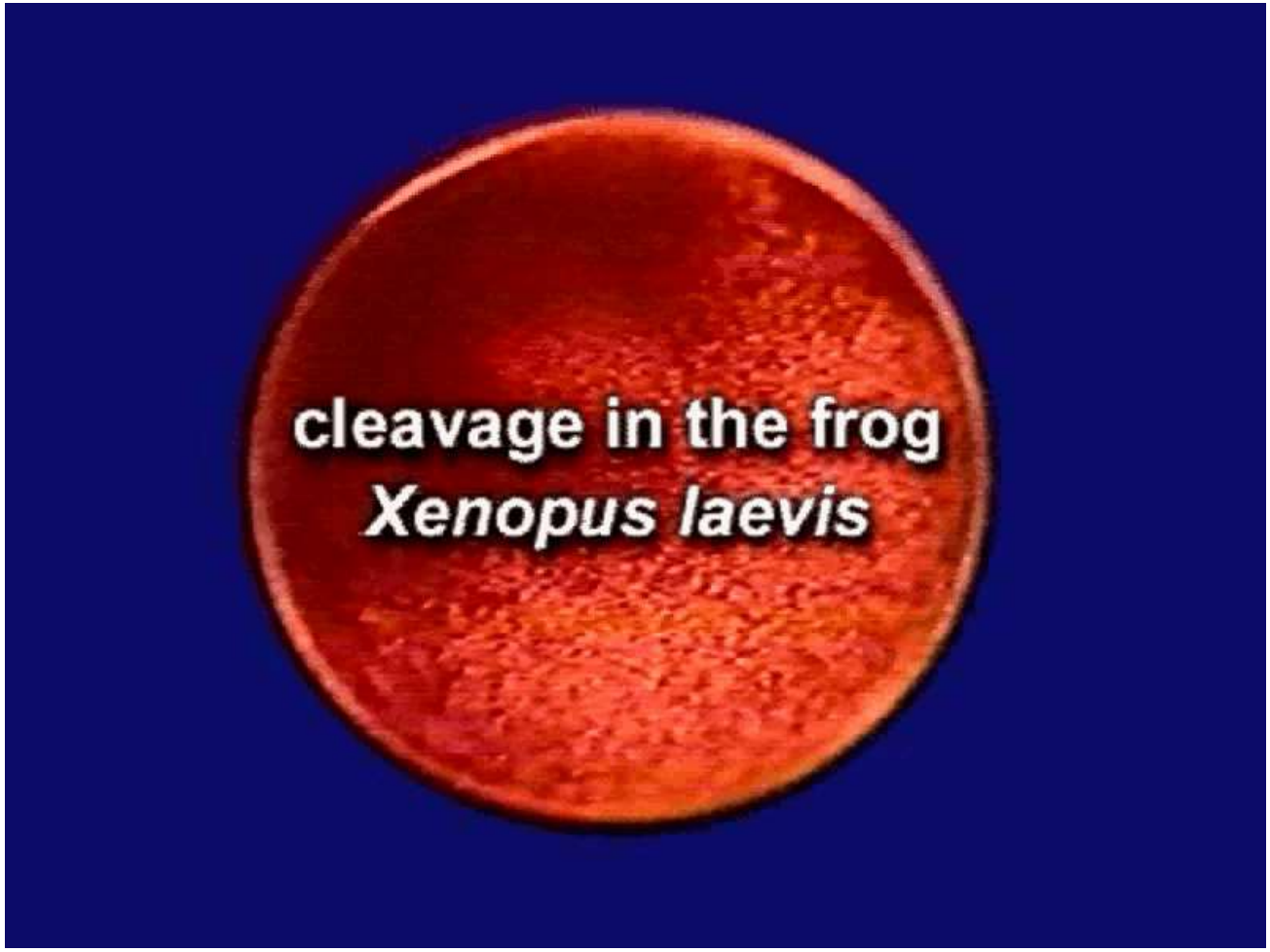
- Cortikales Cytoplasma wird durch die Befruchtung neu organisiert (rotiert)
- Gastrulation beginnt in dem Bereich der gegenüber dem Eintrittsort der Spermien ist (Grauer Halbmond)

Furchungsteilungen



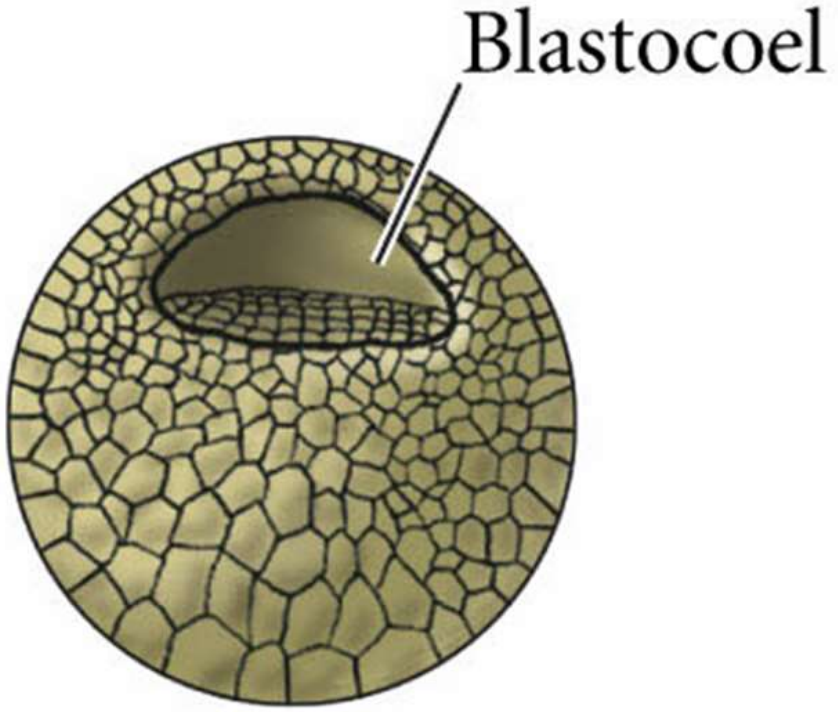
- inäquale Radiärfurchung
- Typisch für Amphibien
- Teilung etwa alle 20 min
- mehrschichtige Blastula
- 12. Teilung: "mid blastula transition" = Aktivierung erster Gene des Embryos

Furchungsteilungen



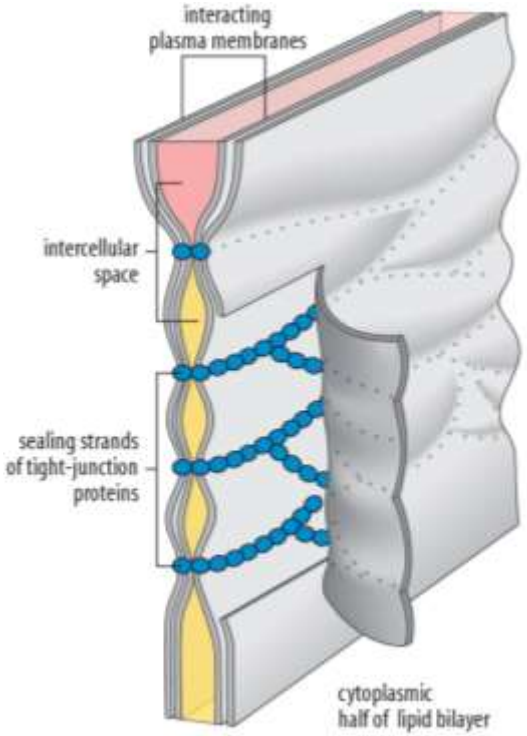
Blastocoel

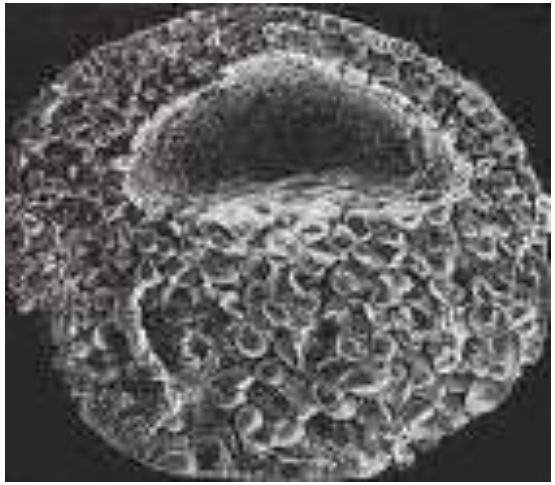
- Blastocoel formiert sich ab 128-Zellstadium
- Zelladhäsionsproteine (EP-Cadherin) hält Blastomere zusammen
- Blastocoel verhindert vorzeitige Determination (Vegetative Zellen induzieren Mesoderm
- => Bei Kontakt mit animalen Zellen werden diese zu Mesoderm statt zu Ektoderm; Kontakt wird durch Blastocoel verhindert)

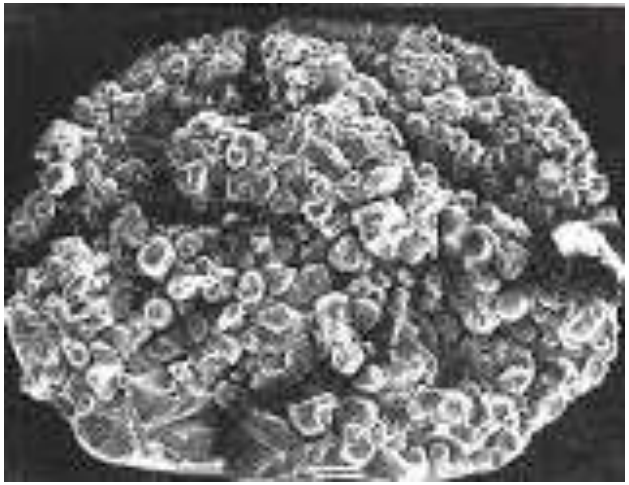


Blastocoel

- Blastocoel formiert sich ab 128-Zellstadium
- Zelladhäsionsproteine (EP-Cadherin) hält Blastomere zusammen
- Blastocoel verhindert vorzeitige Determination (Vegetative Zellen induzieren Mesoderm
- => Bei Kontakt mit animalen Zellen werden diese zu Mesoderm statt zu Ektoderm; Kontakt wird durch Blastocoel verhindert)



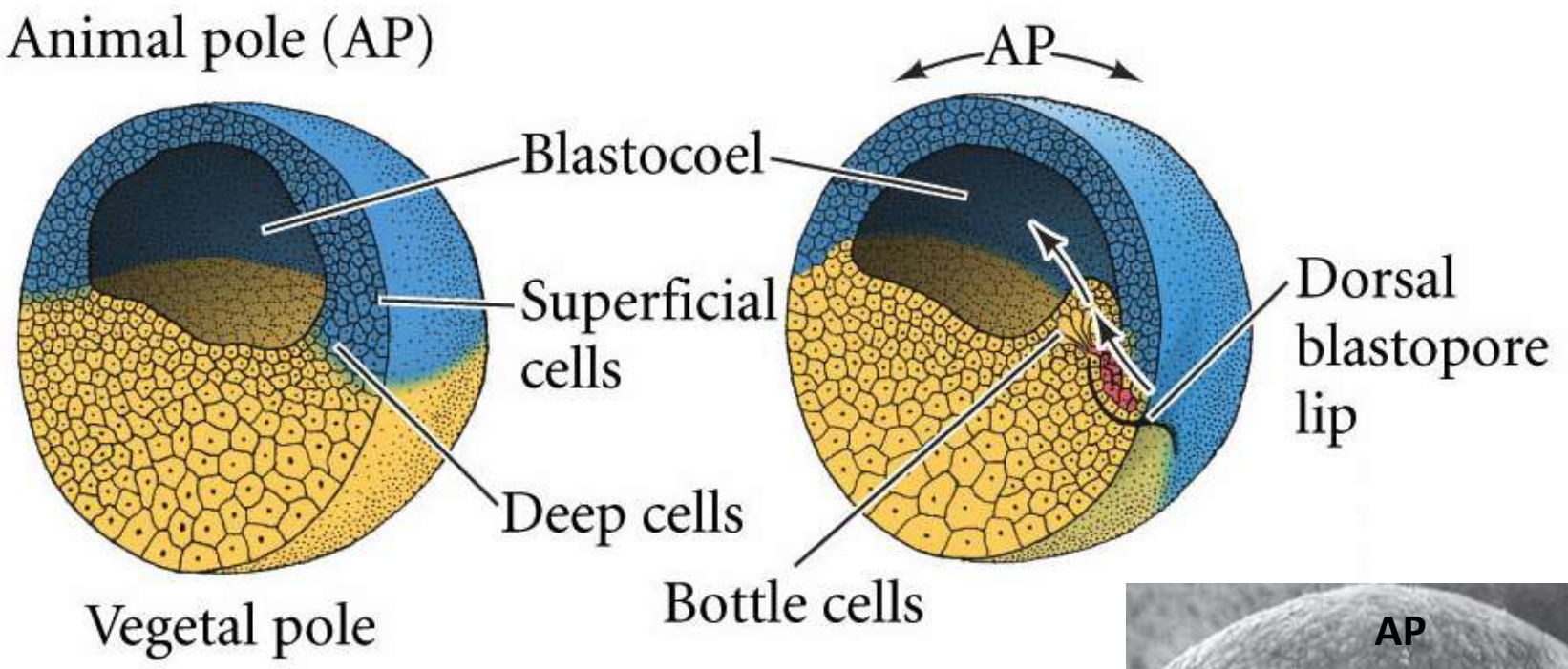




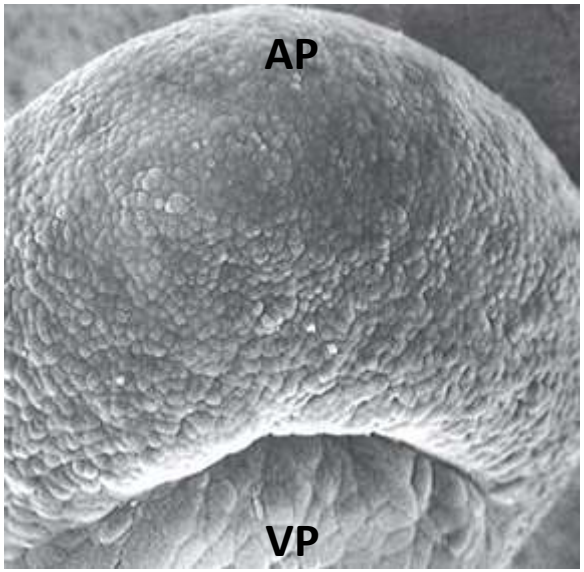
Befruchtung, Furchung und Blastula

- Das Froschei ist mesolecithal und telolecithal.
- Bei der Befruchtung kommt es zur Depolarisation und Ca^{2+} -Freisetzung. Das bewirkt die Freisetzung der Kortikalgranula, die die Befruchtungsmembran bildet und somit Polyspermie verhindert.
- Die Furchung ist ein inäquale Radiärfurchung.
- Ab der 7. Furchung (128-Zellstadium) beginnt die Bildung des Blastocoels.
- Ab der 12. Furchung werden embryonale Gene angeschaltet (mid blastula transition)
- Blastocoel verhindert vorzeitige Determination (Vegetative Zellen induzieren Mesoderm

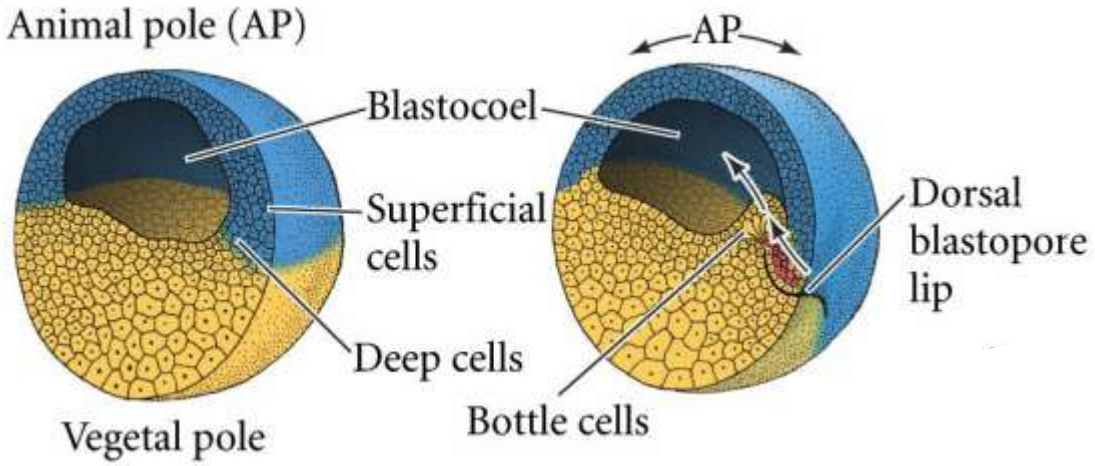
Gastrulation



- Gastrulation beginnt an der dorsalen Urmundlippe
- Zellen der Urmundlippe verändern ihre Form zu den sog. "Flaschenzellen„
- Flaschenzellen initiieren die Einstülpung (Involution) des Urmundes

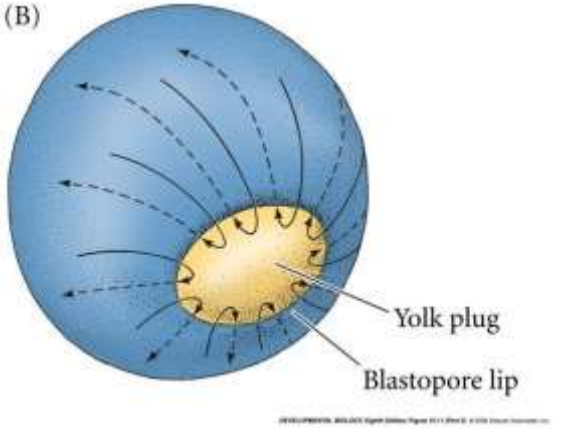


Gastrulation

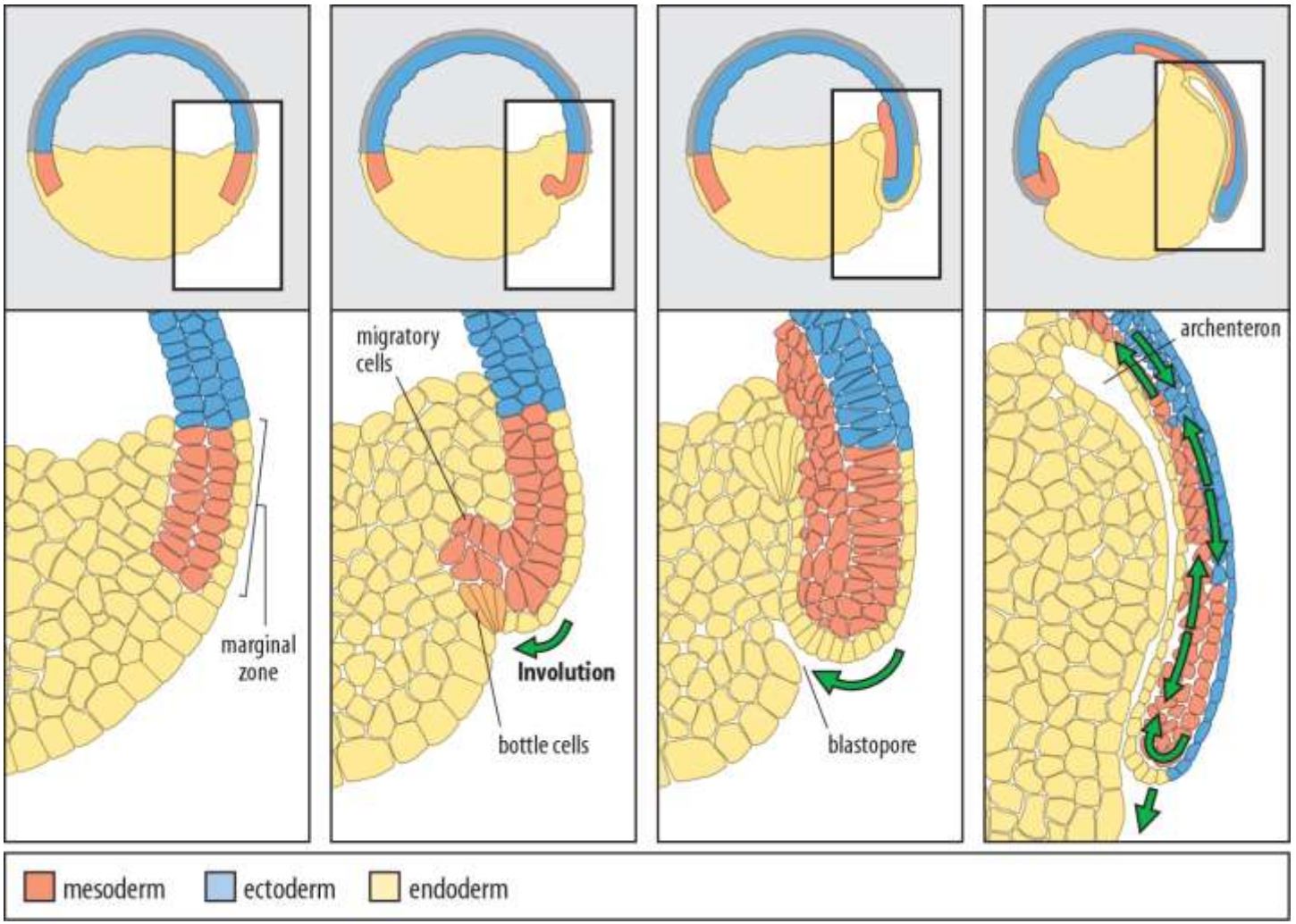


Gastrulation: Epibolie

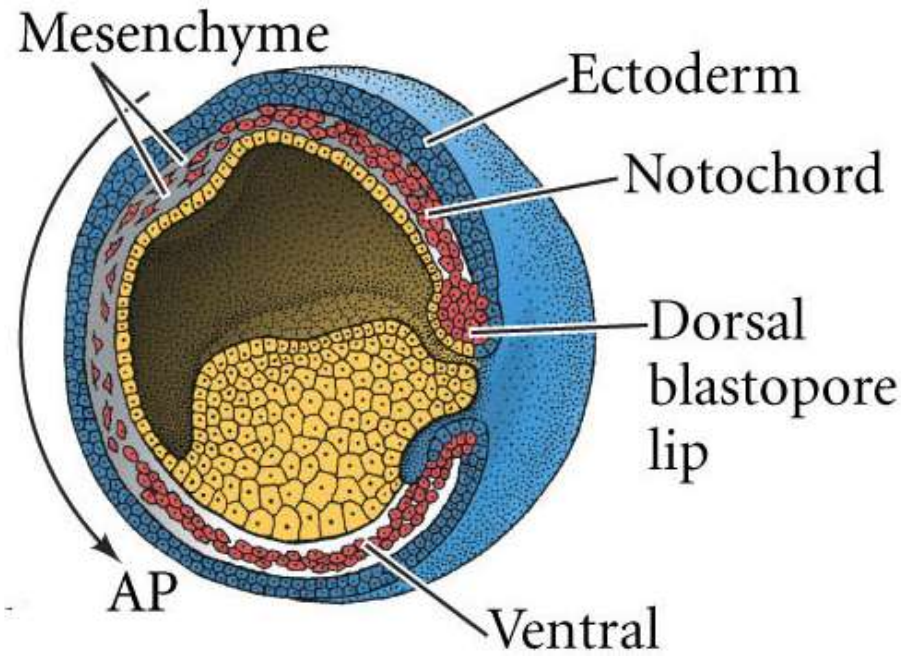
- Epibolie: Ektoderm (verstärkte Zellteilung) umwächst Endoderm



Gastrulation: Epibolie



Keimblattbildung

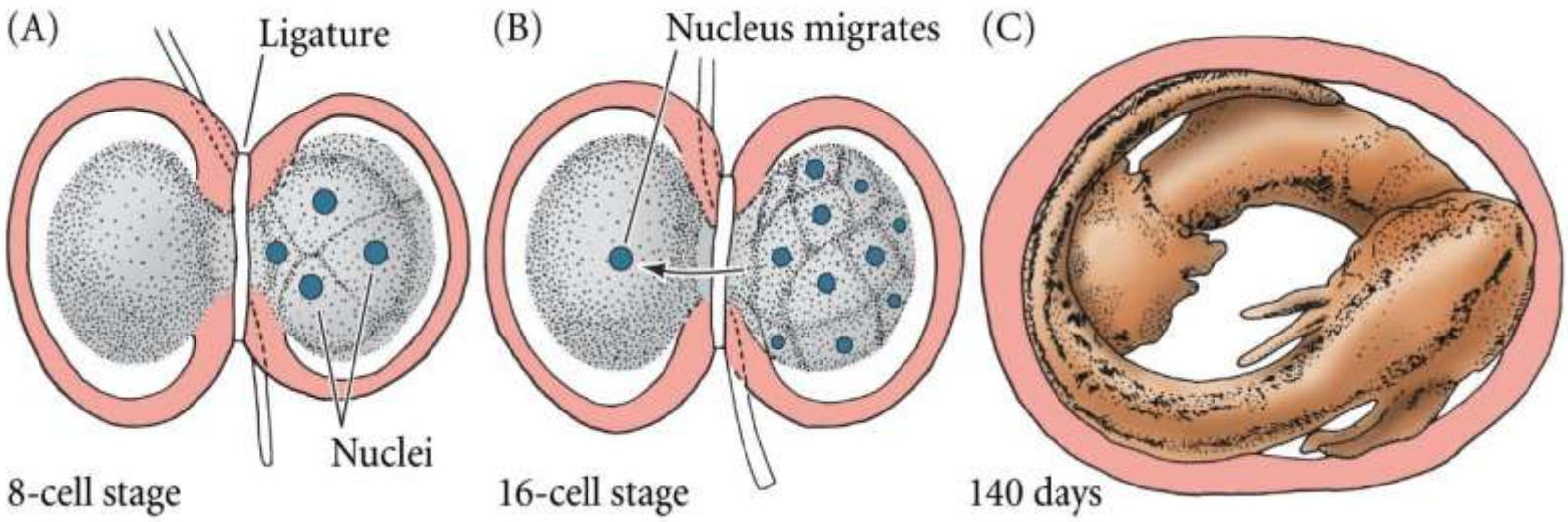


- **Entoderm** = Urdarm (Archenteron)
- **Mesoderm** differenziert sich aus Urdarmdach; liegt zwischen Ento- und Ektoderm
- **Ektoderm** = Außenschicht; Epidermis + Neuroektoderm

Gastrulation

- Die Gastrulation beginnt an der oberen Urmundlippe, wo sich der Urdarm einstülpt (Involution).
- Die Involution wird von den sog. Flaschenzellen initiiert.
- Das zukünftige Endoderm wird vom Ektoderm umwachsen (Epibolie).
- An der Kontaktstelle zwischen Ekto- und Endoderm entsteht Mesoderm, so dass drei Keimblätter resultieren.

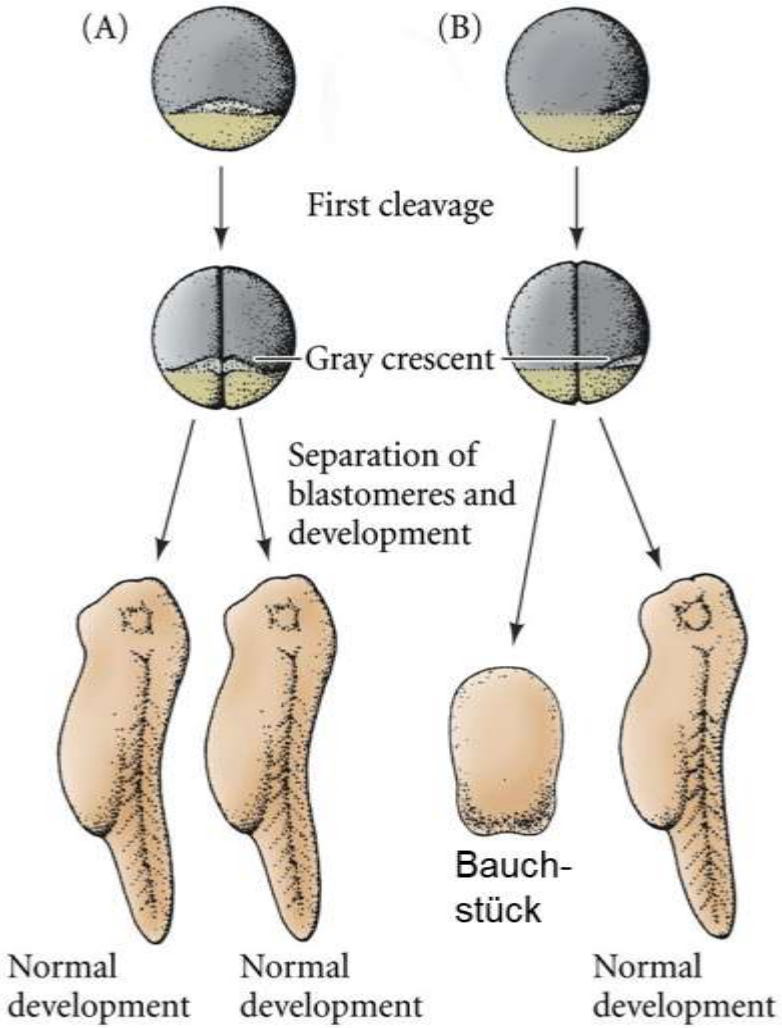
Schnürungsexperiment



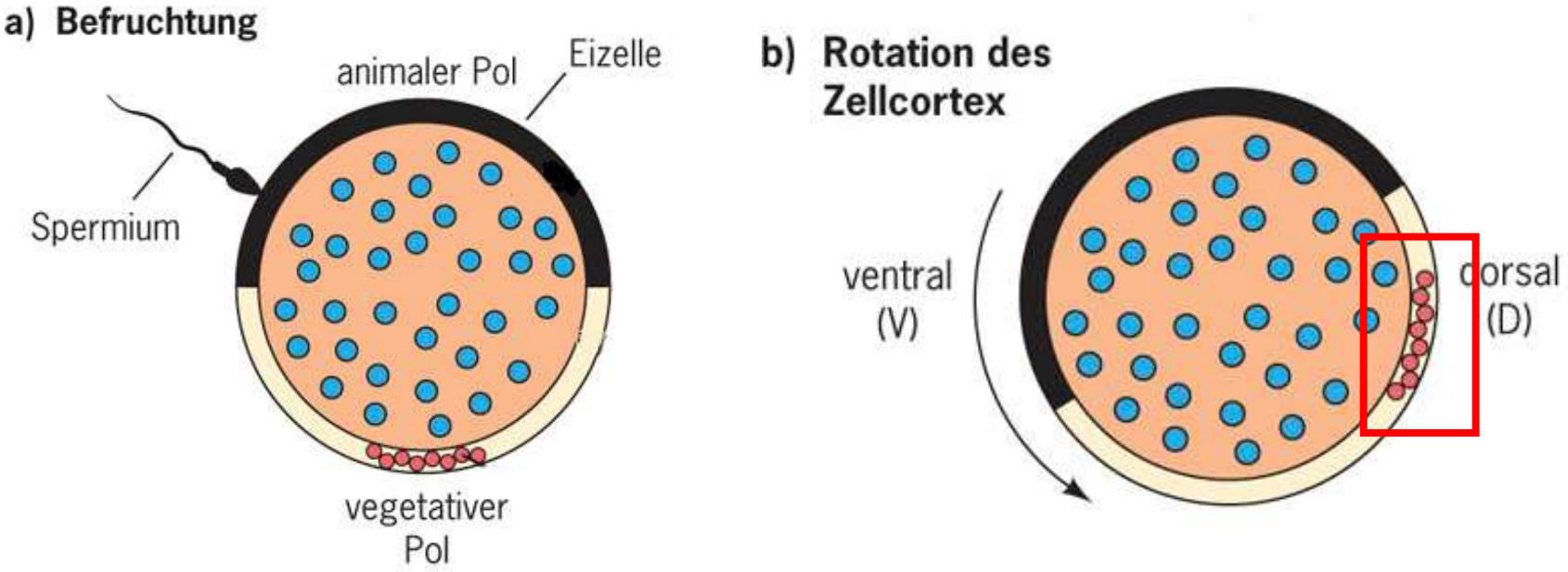
- Frühe Nuklei sind äquivalent und totipotent

Reorganisation des Ooplasmas

- nur Embryo mit grauen Halbmond (=> Urmundlippe) entwickelt sich normal, gegenüberliegende Hälfte wird zu "Bauchstück"

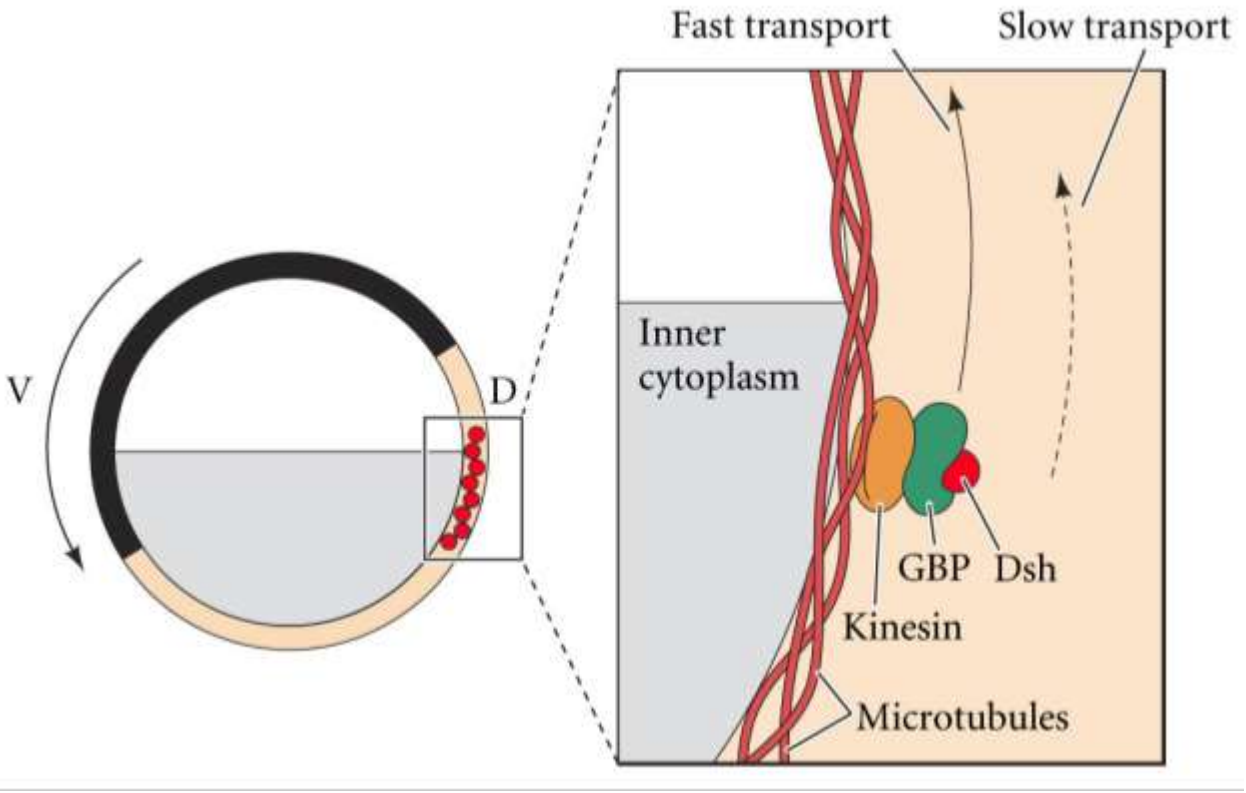


Reorganisation des Ooplasmas



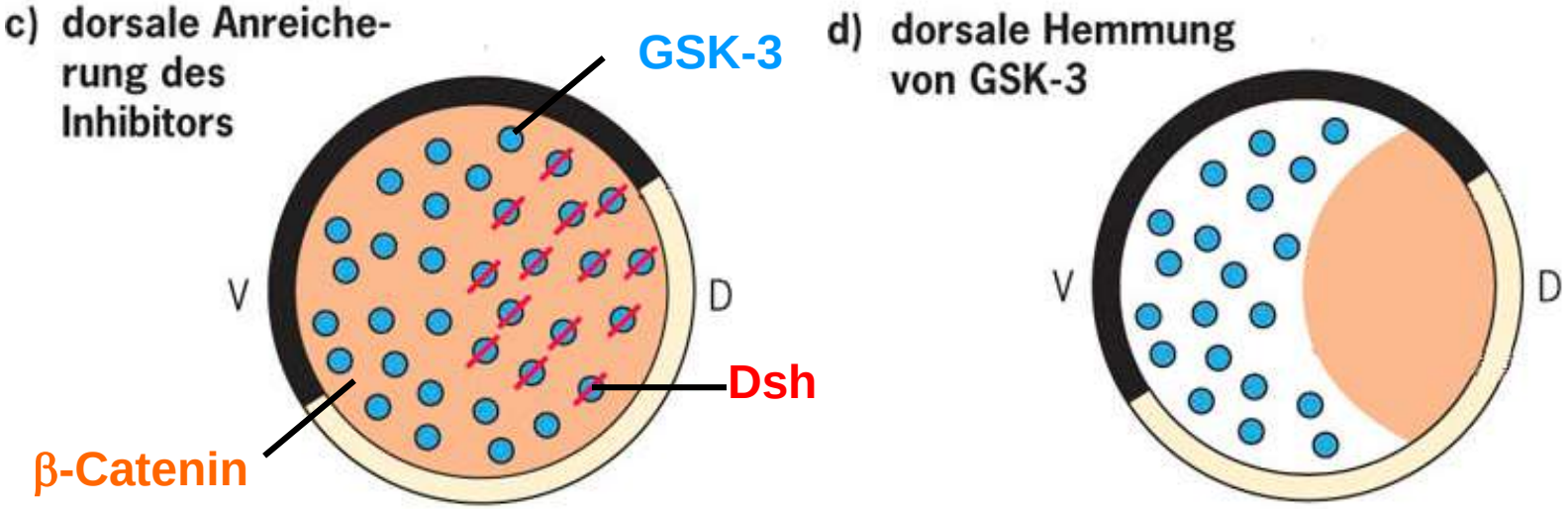
- Nach der Befruchtung kann das Ei unter Befruchtungsmembran frei rotieren
  => vegetativer Pol lagert sich nach unten
- Cortex (Eirinde = massendichtes Cytoplasma unter Zellmembran) ist mit Mikrotubuli durchzogen, die durch Interaktion mit Kinesin verschoben werden. Dadurch kommt es zur Rotation des Cortex um ~30°
  => Verlagerung cytoplasmatischer Faktoren

Reorganisation des Ooplasmas



- Rotation des Cortex transportiert **Dsh** („Disheveled“) mittels **GBP** ("GSK-binding protein") und **Mikrotubuli**
- Kinesin vermittelt Interaktion mit Mikrotubuli

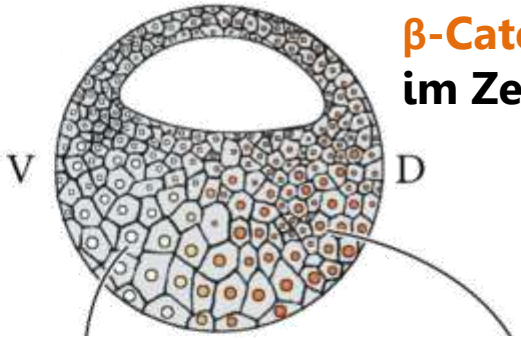
Reorganisation des Ooplasmas



- ventral: GSK-3 => sorgt für Abbau von β-Catenin
- dorsal: Dsh inhibiert GSK-3 => kein Abbau von β -Catenin
  => dorsale Akkumulation von β -Catenin

B-Catenin induziert Goosecoid

Abbau von β-Catenin



β-Catenin im Zellkern

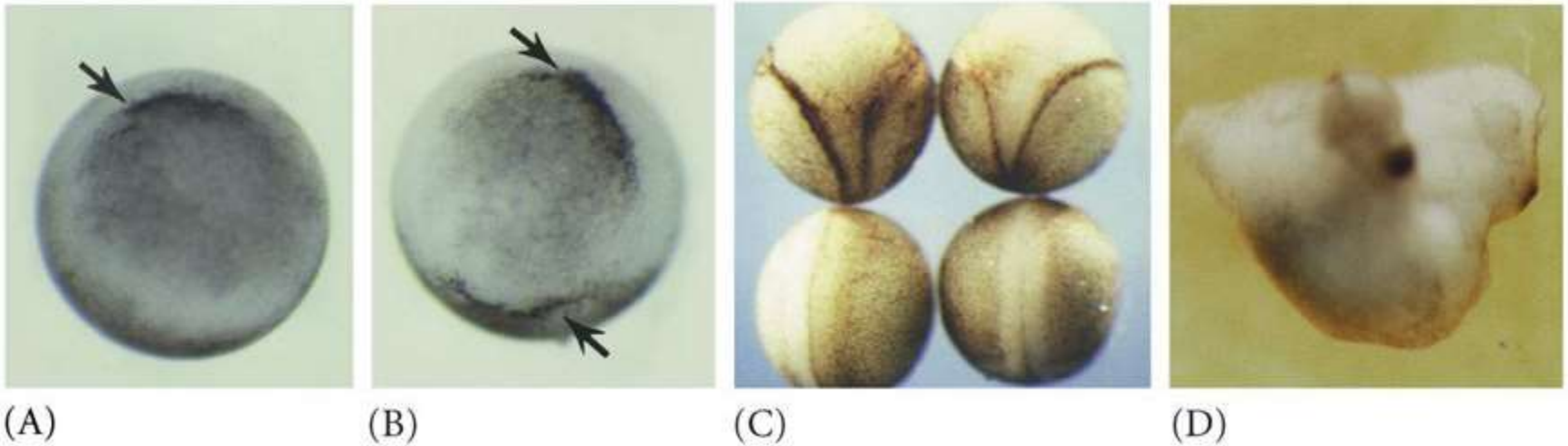
β-Catenin aktiviert Transkriptionsfaktor (Tcf-3)

=> Induktion *dorsaler* Gene (z.B. *siamois*)

=> Siamois induziert *goosecoid*

=> Goosecoid führt zur Spezifikation des **Organisators**

Goosecoid dient der Ausbildung der Achse



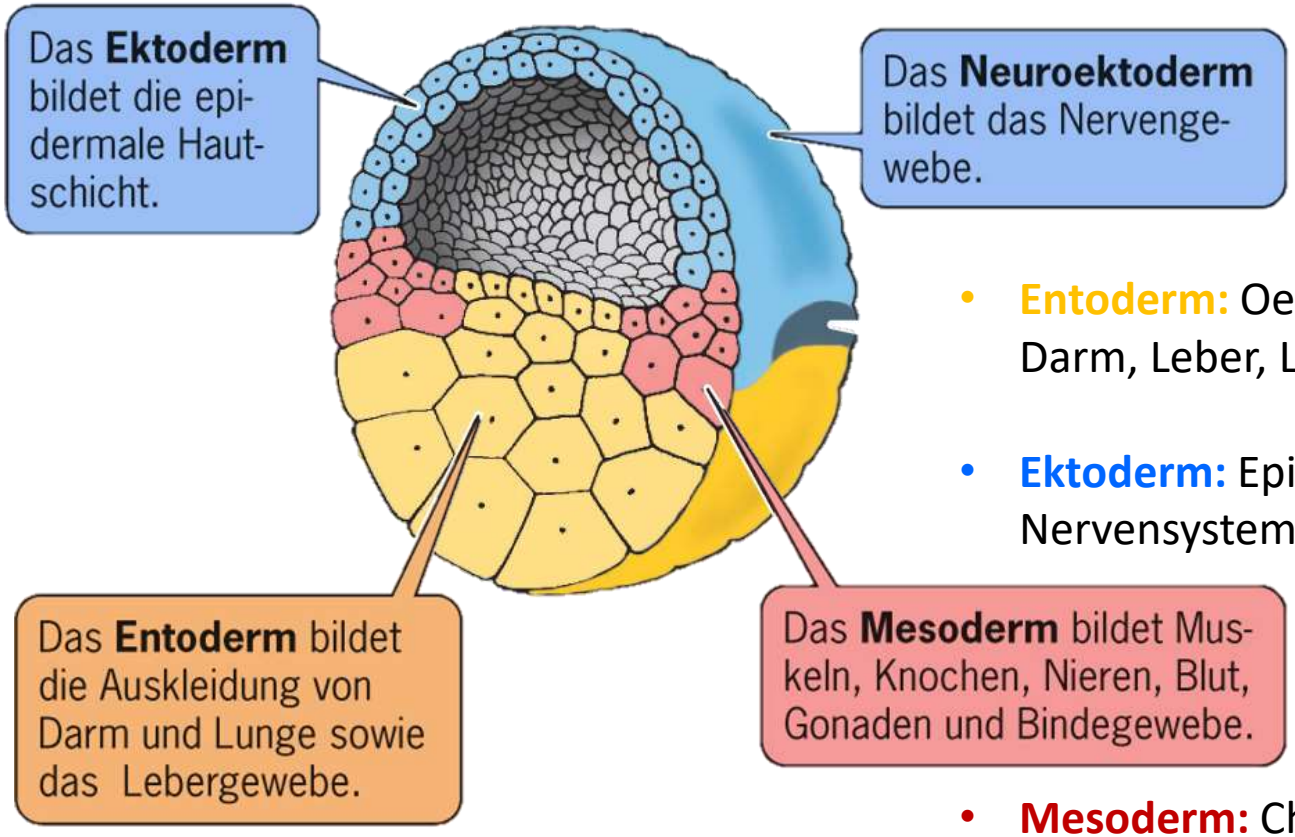
Entstehung der Körperachsen und Determination I

- Die Körperachse des Froschembryo wird durch den Aufbau der Eizelle (animaler und vegetativer Pol) sowie die Eintrittstelle des Spermiums bestimmt.

- Gegenüber der Eintrittstelle des Spermiums entsteht durch Rotation des äußeren Cytoplasmas der „graue Halbmond“.

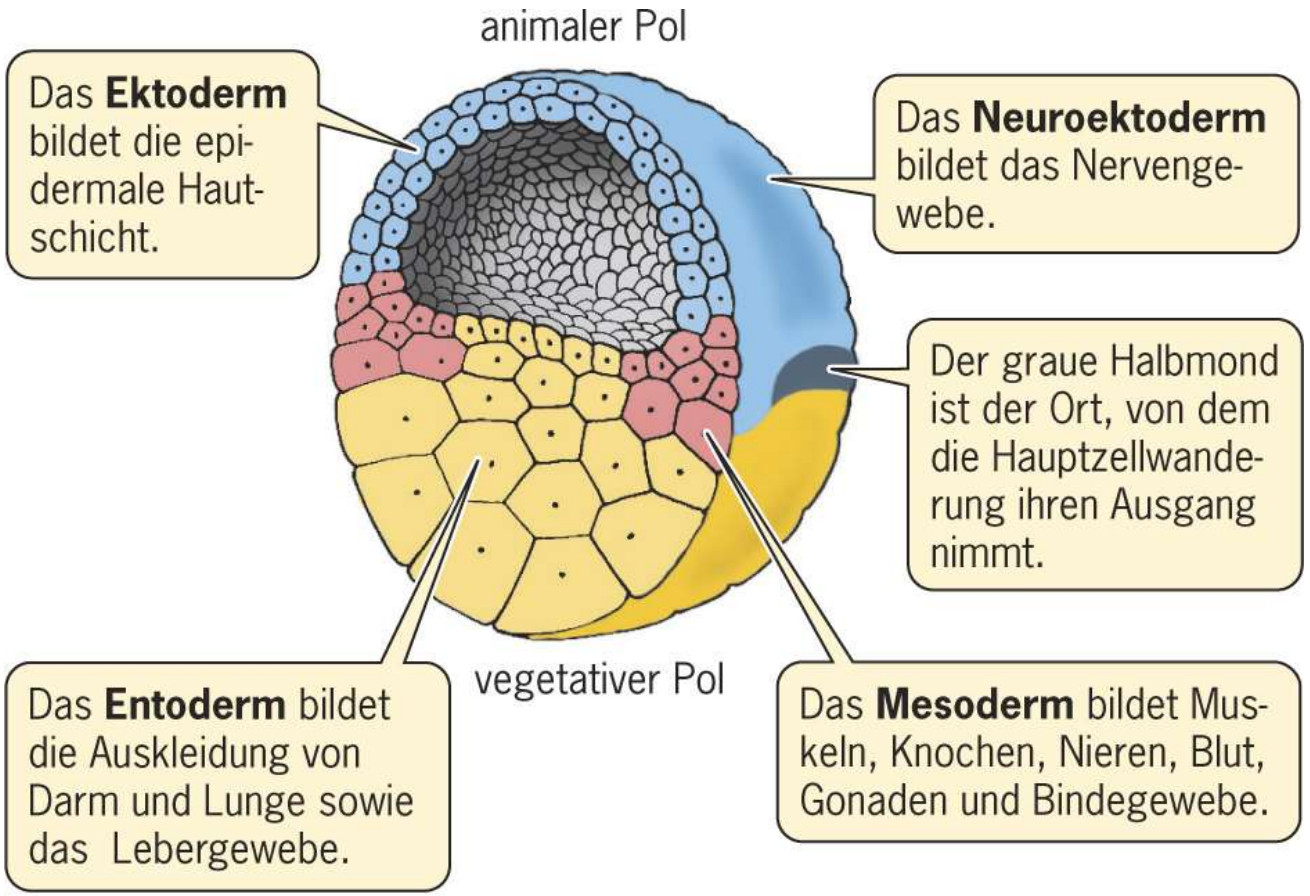
- Im weiteren Verlauf kommt es zur Ungleichverteilung zytoplasmatischer Faktoren, die zur Bildung des Spemann-Organisators im Bereich des grauen Halbmondes führen.

Organogenese


Das **Ektoderm** bildet die epidermale Hautschicht.
Das **Neuroektoderm** bildet das Nervengewebe.
Das **Entoderm** bildet die Auskleidung von Darm und Lunge sowie das Lebergewebe.
Das **Mesoderm** bildet Muskeln, Knochen, Nieren, Blut, Gonaden und Bindegewebe.

- **Entoderm:** Oesophagus, Magen, Darm, Leber, Lunge, Harnblase
- **Ektoderm:** Epidermis, Pigmentzellen, Nervensystem (Neuroektoderm)
- **Mesoderm:** Chorda dorsalis, Skelett, Muskulatur, Herz, Blut, Nieren, Dermis

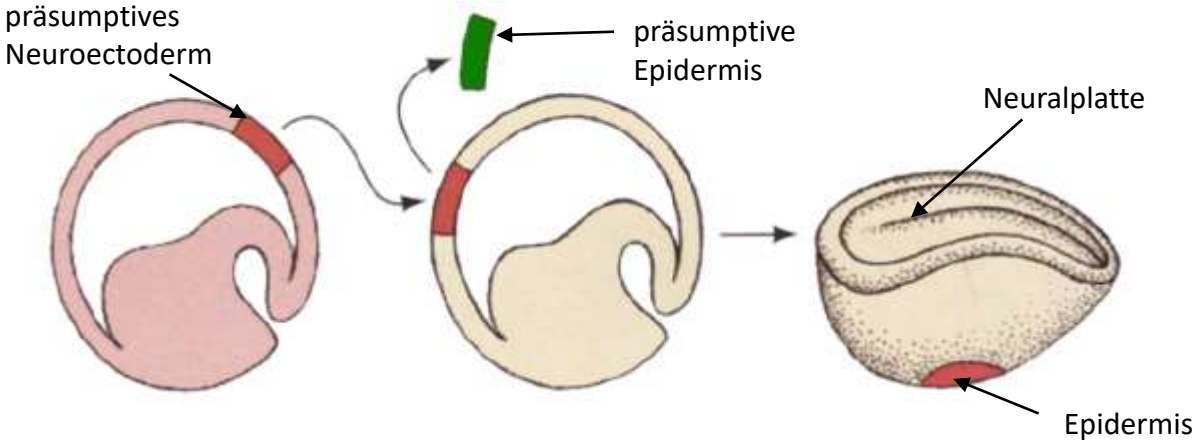
Organogenese


animaler Pol
Das **Ektoderm** bildet die epidermale Hautschicht.
Das **Neuroektoderm** bildet das Nervengewebe.
Der graue Halbmond ist der Ort, von dem die Hauptzellwanderung ihren Ausgang nimmt.
vegetativer Pol
Das **Entoderm** bildet die Auskleidung von Darm und Lunge sowie das Lebergewebe.
Das **Mesoderm** bildet Muskeln, Knochen, Nieren, Blut, Gonaden und Bindegewebe.

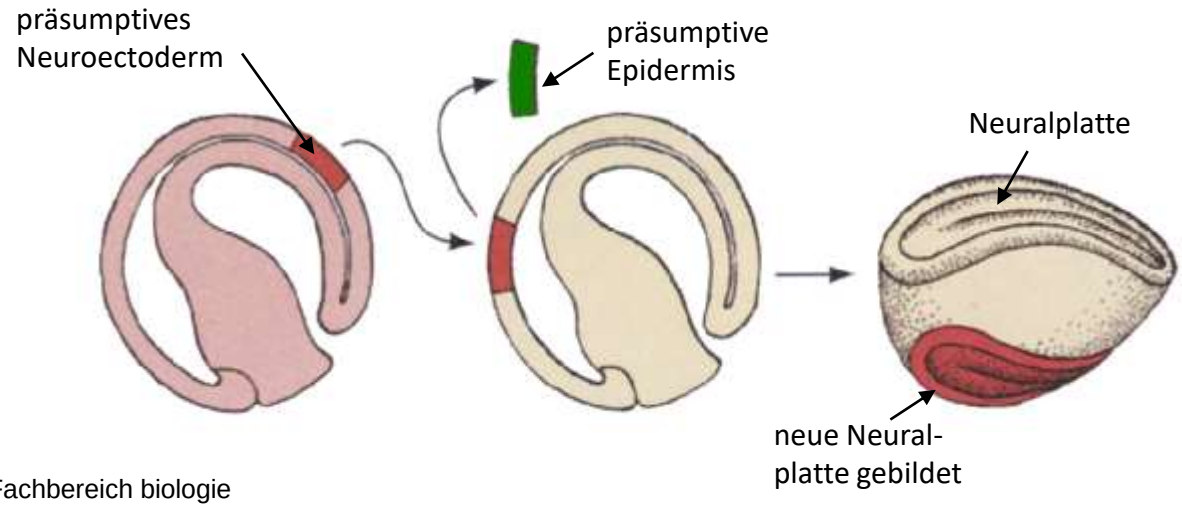
Aus Purves/Sadava/Orians/Heller, *Biologie*, 7. Aufl., © 2006 Elsevier GmbH

Determination des Ektoderms

A. Transplantation in früher Gastrula



B. Transplantation in später Gastrula

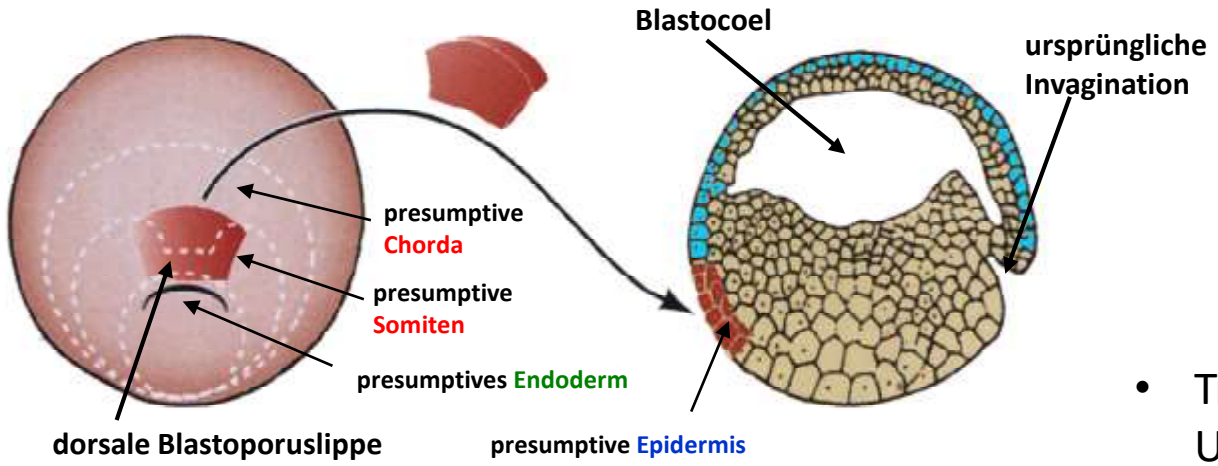


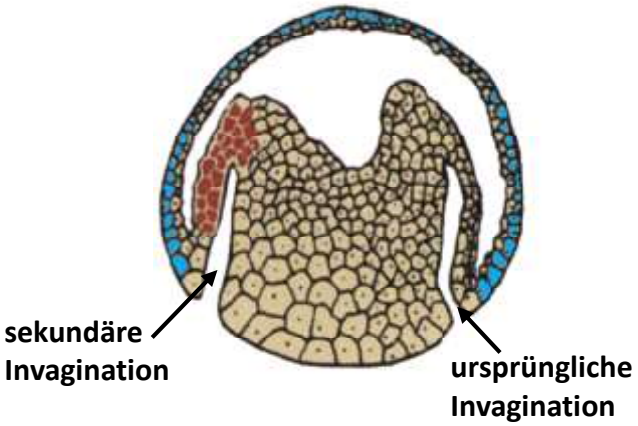
A. Frühe Gastrula = Entwicklung **ortsgemäß**

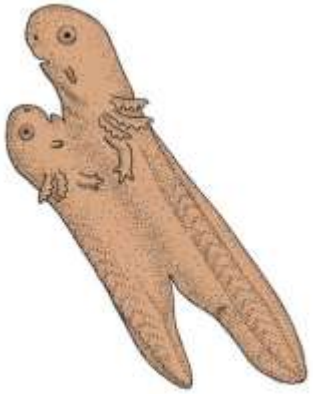
B. Späte Gastrula = Entwicklung **herkunftsgemäß** (hat zuvor eine Positionsinformation abgespeichert)

= Determination

Spemann-Organisator







- Transplantation der oberen Urmundlippe in frühen Gastrula => Induktion der Gastrulation => Zweitembryo (aus Wirtsgewebe)
- Obere Urmundlippe bereits in früher Gastrula determiert
- "primärer Organisator": beeinflusst umliegendes Gewebe (entdeckt von Hans Spemann)

Entstehung der Körperachsen und Determination II

- Determination: Das Schicksal der Zelle ist festgelegt, und kann in der Regel auch durch veränderte äußere Einflüsse nicht verändert werden.

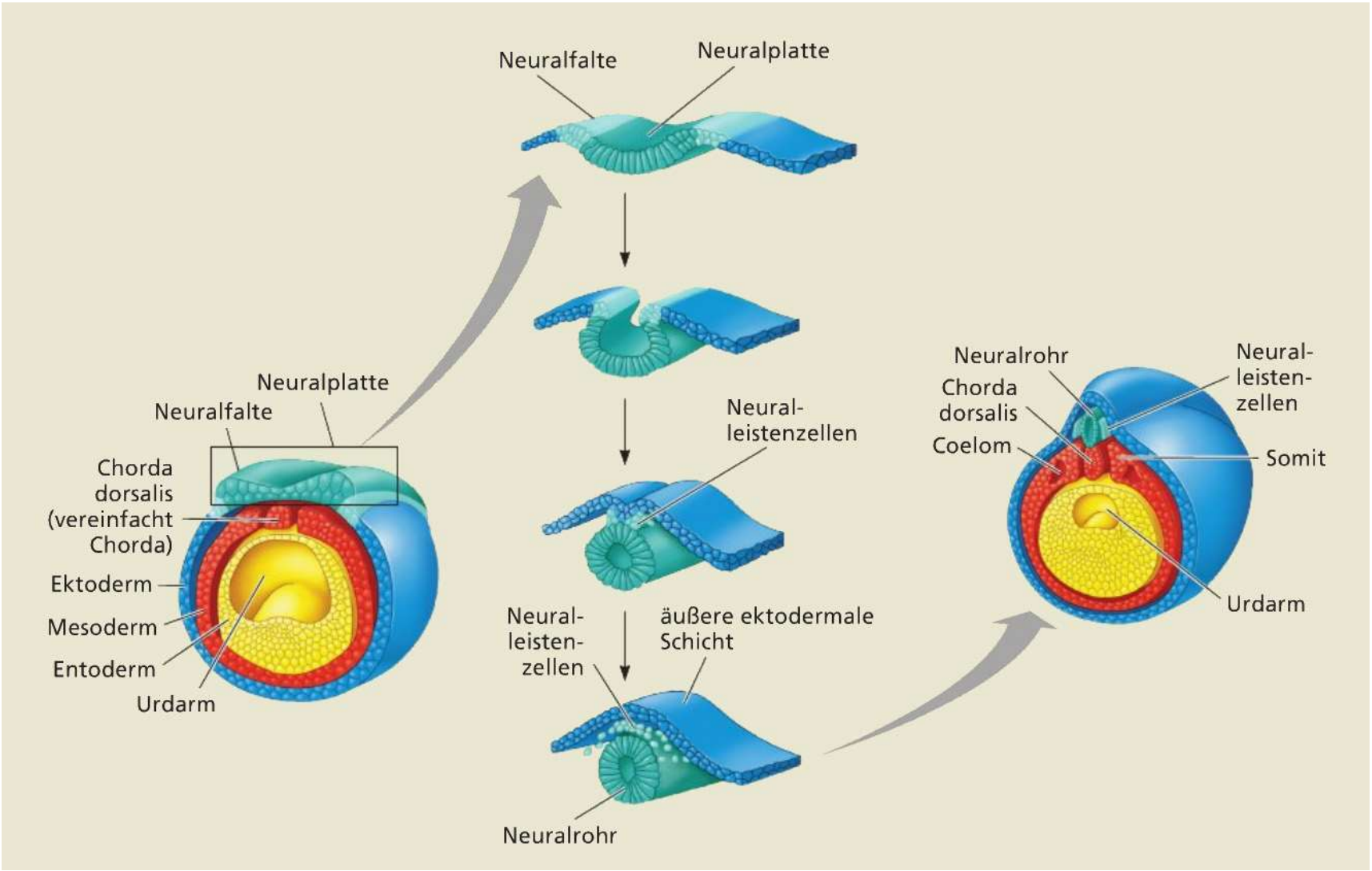
- Im weiteren Verlauf kommt es zur Ungleichverteilung zytoplasmatischer Faktoren, die zur Bildung des Spemann-Organisators im Bereich des grauen Halbmondes führen.

- Der Spemann-Organisator beeinflusst die folgende Embryogenese maßgeblich, zum Beispiel durch Bildung von Transkriptionsfaktoren.

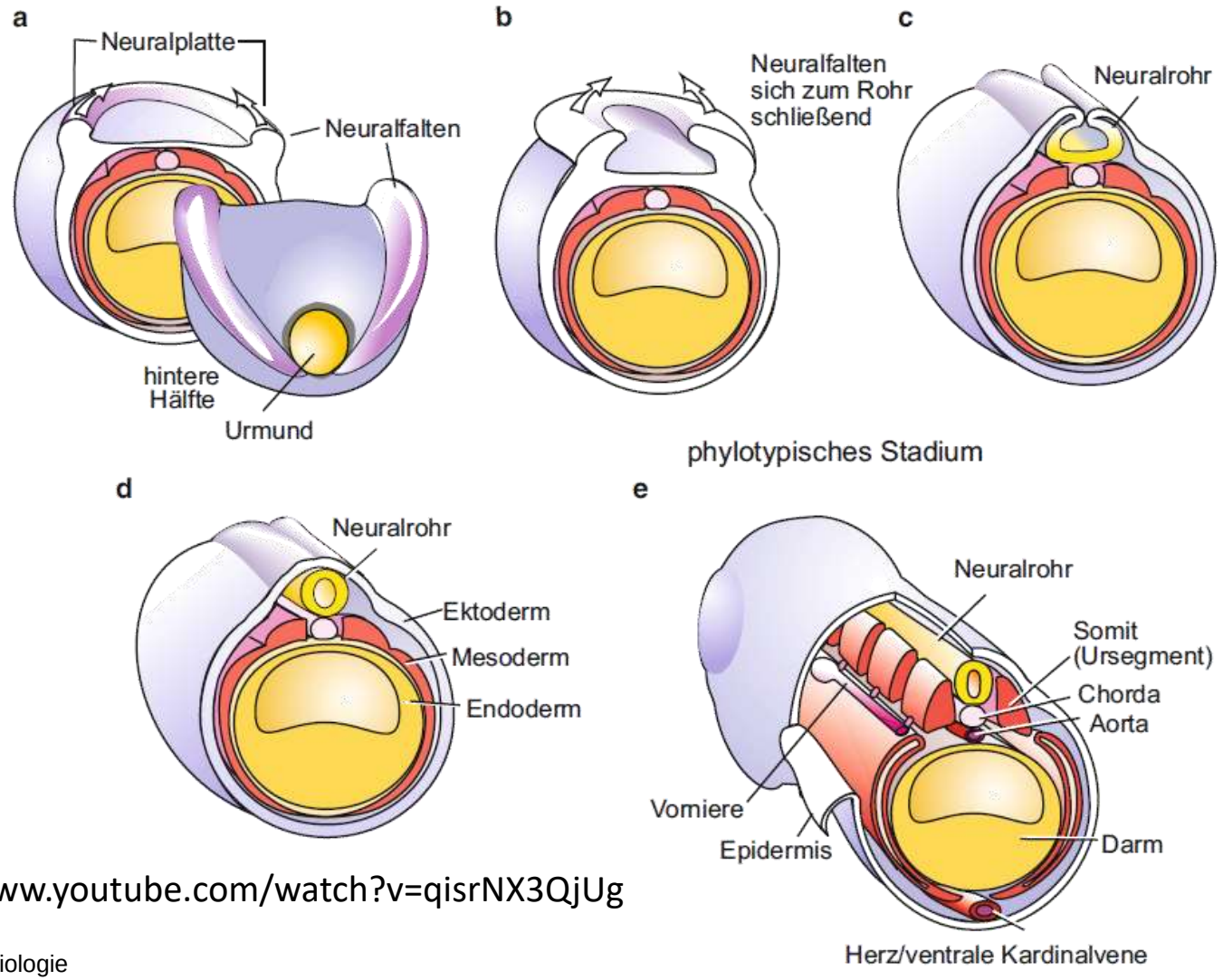
Organogenese: Neurulation

- Neurulation = Ausbildung der Anlagen für Gehirn und Rückenmark als Neuralrohr

Ausbildung des Neuralrohrs



Ausbildung des Neuralrohrs



http://www.youtube.com/watch?v=qisrNX3QjUg

Neurulation

- Die Neurulation beginnt mit der Bildung der Neuralplatte an der Dorsalseite des Embryos.
- Zwischen den Neuralfalten (Neuralwülste) schließt sich das Neuralrohr.
- Die Ränder der Neuralfalten bilden die Neuralleisten.

Organogenese: Mesoderm

Fünfgliedriges Mesoderm bildet:

- **Chorda dorsalis**
- **Seitenplatten**: Umschließen Coelom (sek. Leibeshöhle)
- **Somiten**: Mesodermpakete (segmental)

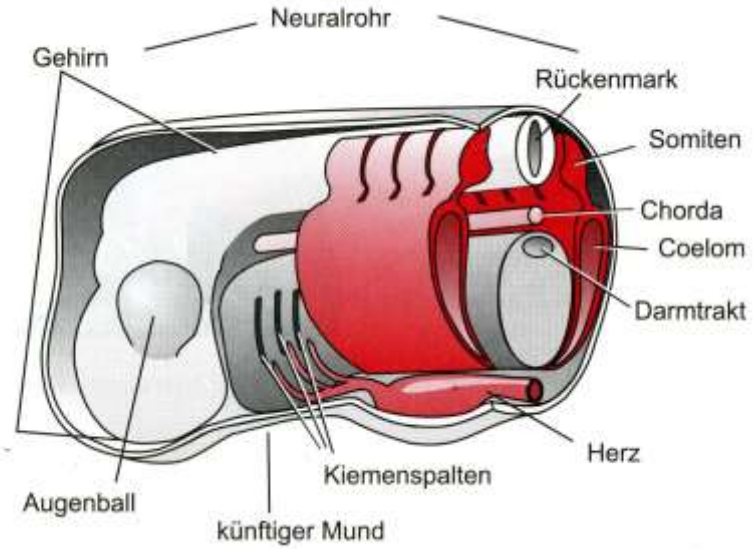
Somiten

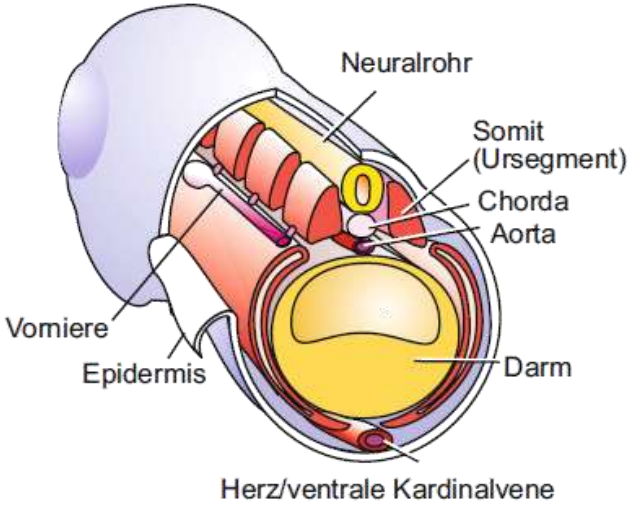
Sklerotom (=> Wirbel)

Myodermatom

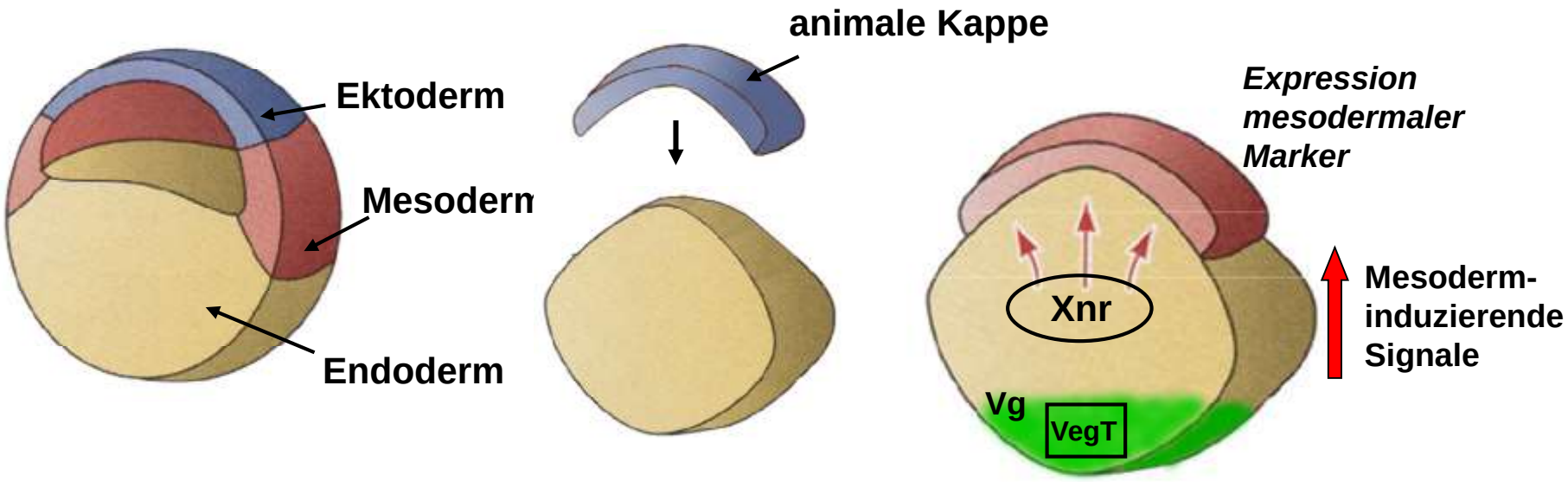
Myotom (=> Muskel)

Dermatom (=> Dermis)



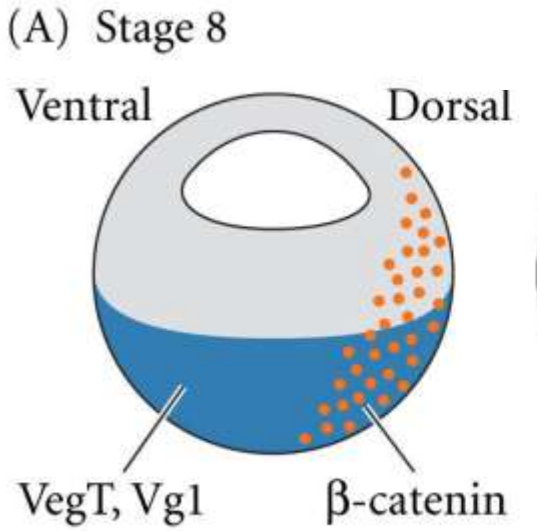


Mesoderminduktion



- Umwandlung des presumptiven Ektoderms in Mesoderm durch vegetative Zellen
- in vivo verhindert Blastocoel vorzeitigen Kontakt
- Xnr: Xenopus Nodal-related

Mesoderminduktion



b-Catenin → **Nodal-related (Xnr) hoch** → **Organisator**

VegT, Vg-1 → **Nodal-related (Xnr) niedrig** → **ventrales Mesoderm**

- VegT: Transkriptionsfaktor
- Vg-1, Xenopus nodal-related (Xnr), BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein): Wachstumsfaktoren der TGF-β-Familie
- Xwnt8: Signal-Faktor der wingless (WNT)-Familie

  => Induktion des Spemann-Organisators in Gastrula

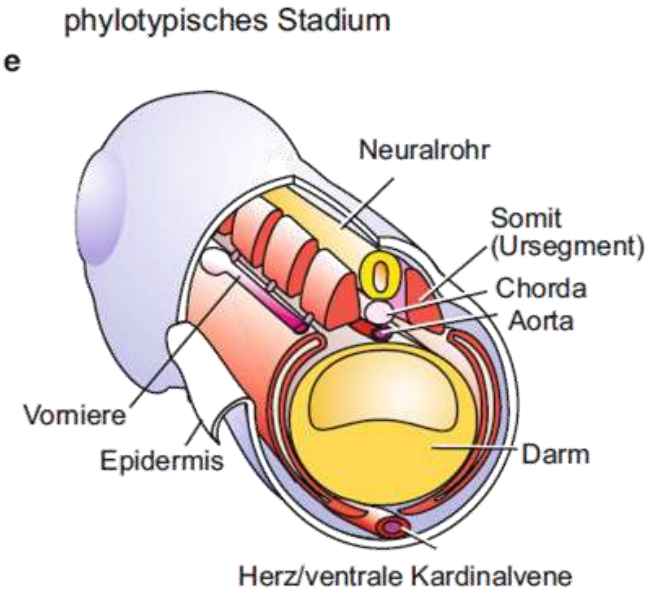
Phylotypisches Stadium (nach Neurulation)

Achsensorgane

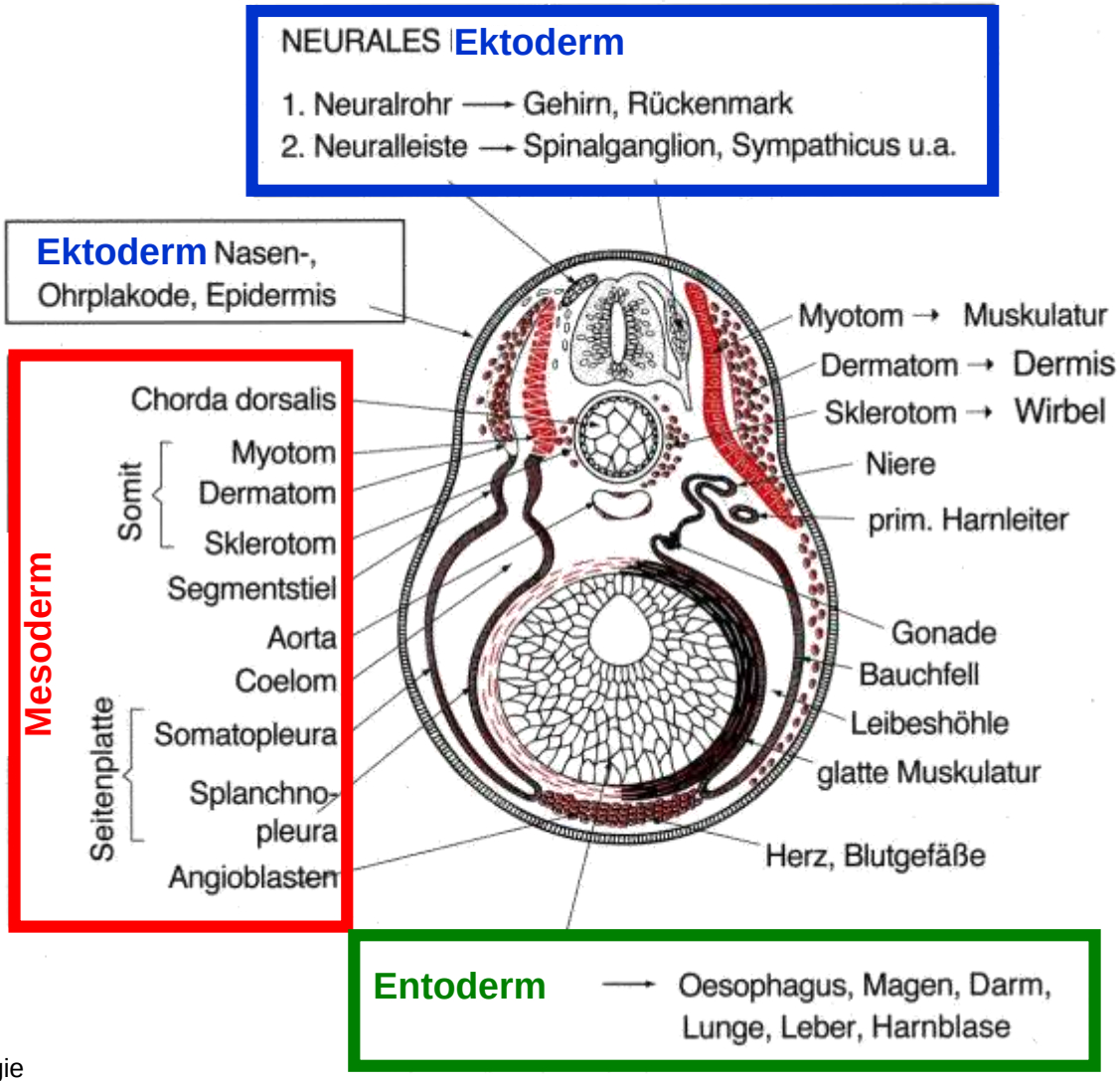
- **Ektodermal:**
- **Neuralrohr** => Gehirn + Rückenmark
- **Neuralleisten** => PNS + Pigmentzellen

- **Mesodermal:**
- **Chorda dorsalis** => embryonaler Platzhalter für Wirbelsäule
- **Somiten** => Wirbelkörper, quergestreifte Muskulatur, Dermis
- **Seitenplatten**
- ventrales **Herz**

- **Entodermal:**
- **Vorderdarm** mit Kiementaschen



Organogenese

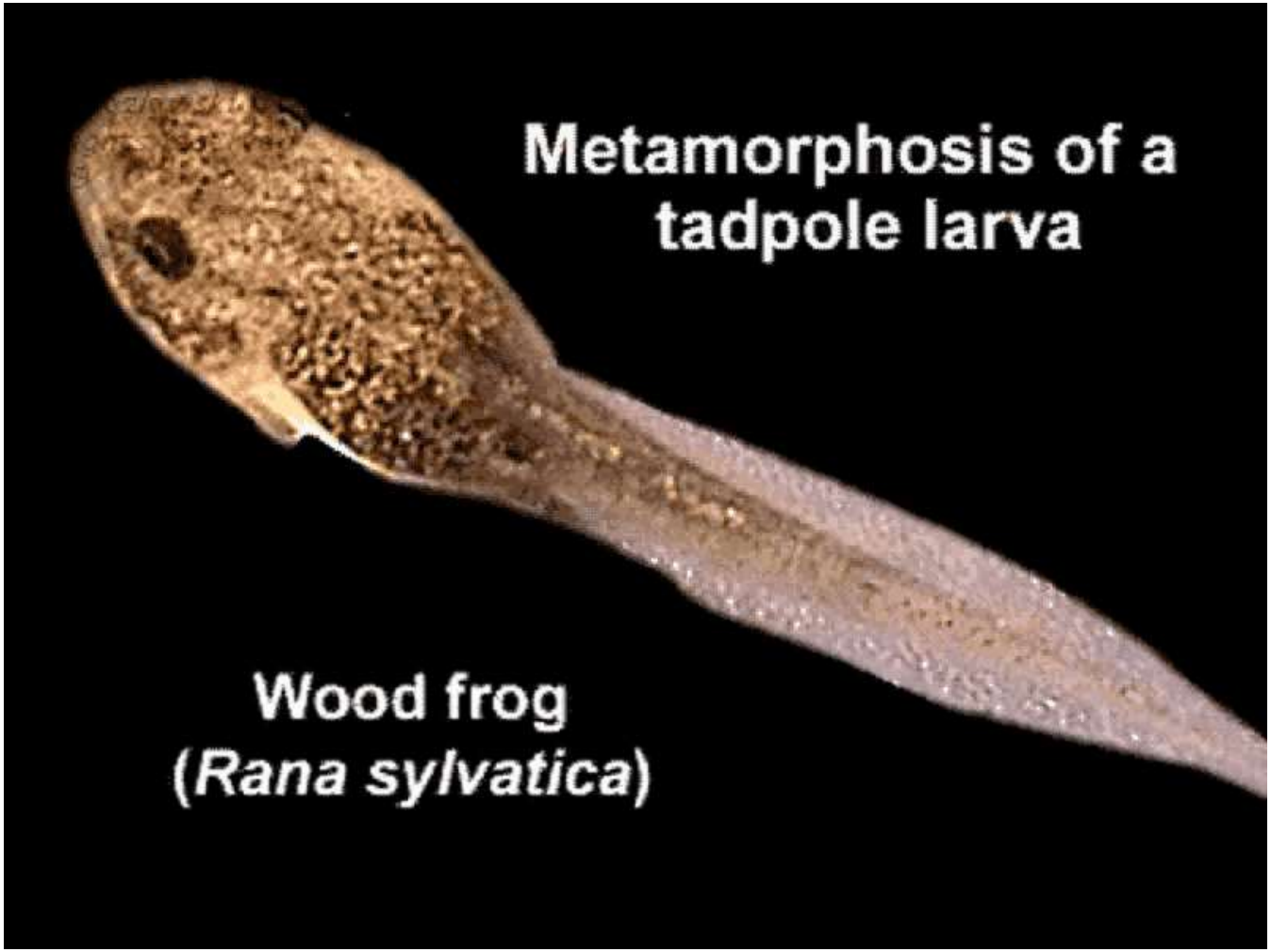


Mesodermentwicklung

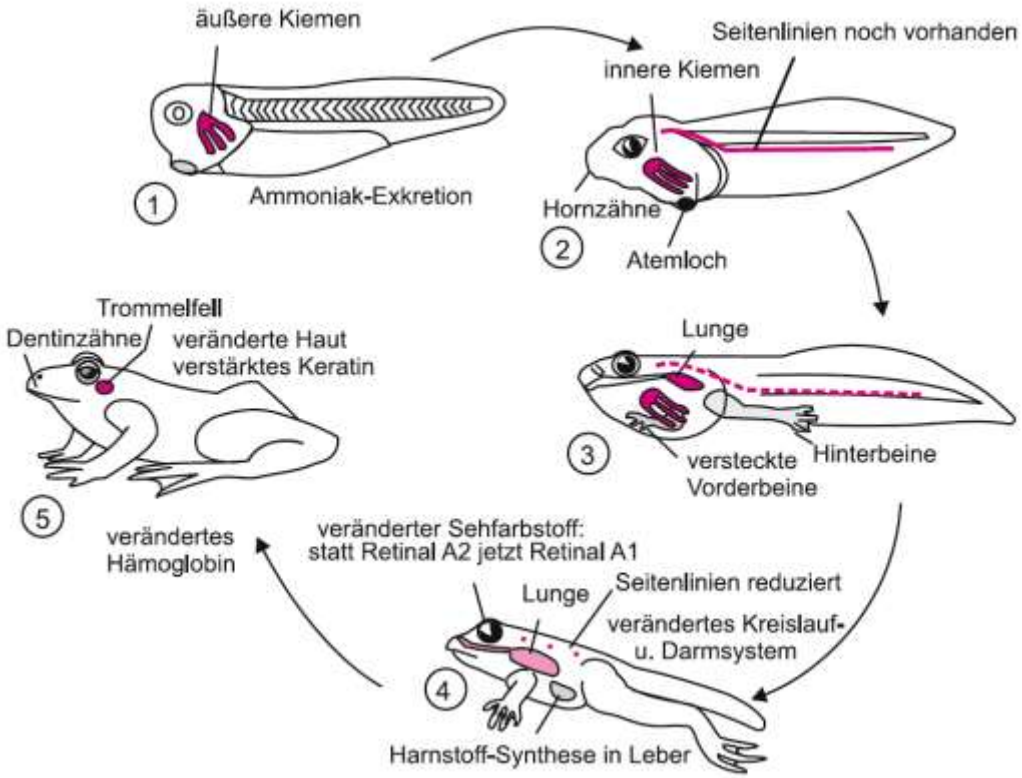
- Das Mesoderm bildet die Chorda dorsalis, die Seitenplatten und die Somiten.

- Aus den Somiten entsteht das Sklerotom, aus dem die Wirbel hervorgehen, und das Myodermatom, aus dem Haut und Muskel hervorgehen.

Metamorphose

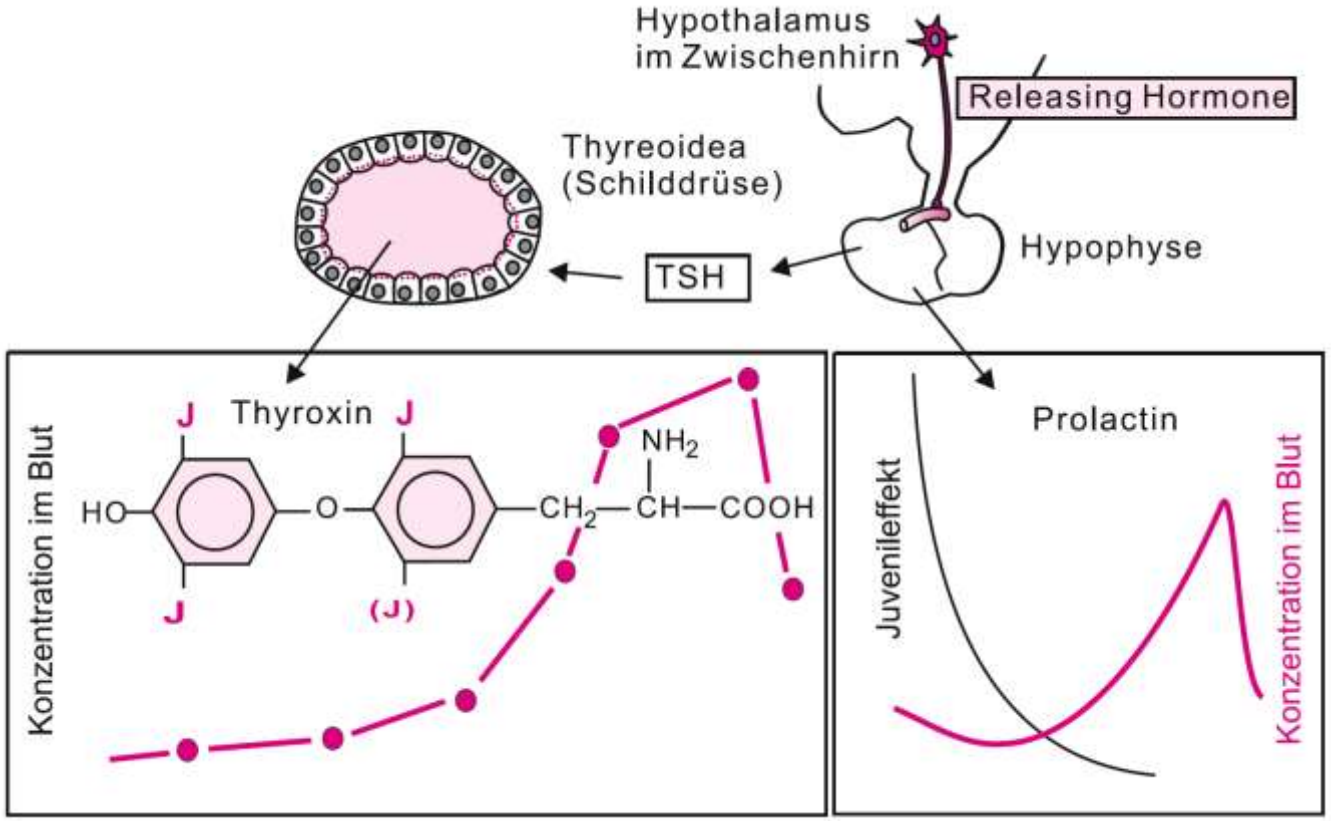


Metamorphose



- Metamorphose = Umwandlung der Körpergestalt
- Resorption larvaler Strukturen (Schwanz, Kiemen, Seitenlinienorgan, ...)
- Ausbildung adulter Strukturen (Extremitäten, Lungen, ...)
- Physiologische Änderungen:
  - Hämoglobin von Kiemenatmung zu Lungenatmung
  - Exkretion: NH_4^+ => Harnstoff
  - Sehfarbstoff: Porphyropsin (wie Fische) => Rhodopsin (wie Landwirbeltiere) ....

Metamorphose



- Die Metamorphose steht unter hormoneller Kontrolle
- Thyroxin: Hemmt Wachstum, fördert Umwandlung
- Prolactin: Besitzt einen dualen Effekt: es fördert den Abbau larvaler Organe, unterstützt den Aufbau adulter Organe.

Metamorphose

- Die Metamorphose (Gestaltsumwandlung) von der Kaulquappe bis zum adulten Frosch geht mit morphologischen und physiologischen Änderungen einher.

- Es entwickeln sich Beine, der Schwanz und die Kiemen werden resorbiert, Lungen werden ausgebildet.

- Anpassung des Hämoglobin an Luftatmung, Umstellung der Exkretion von Ammonium zu Harnstoff…

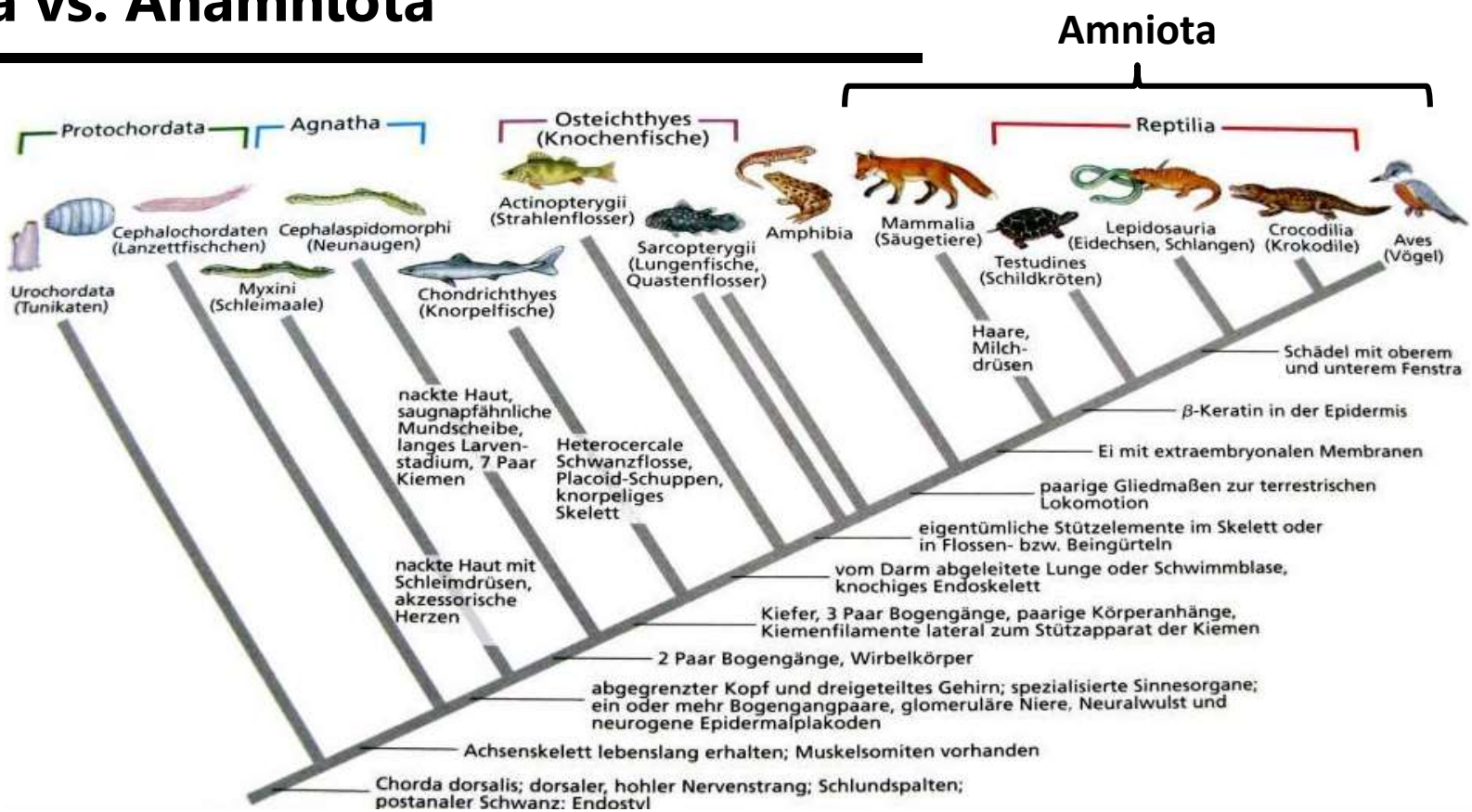
- Die Metamorphose steht unter der Kontrolle der Hormone Thyroxin und Prolactin.

Anamniota vs. Amniota

- Legen Eier im Wasser ab

- Legen Eier am Land ab

Amniota vs. Anamniota


Amniota
Protochordata
Agnatha
Osteichthyes (Knochenfische)
Reptilia
Urochordata (Tunikaten)
Cephalochordaten (Lanzettfischchen)
Myxini (Schleimaale)
Cephalaspidomorphi (Neunaugen)
Chondrichthyes (Knorpelfische)
Actinopterygii (Strahlenflosser)
Sarcopterygii (Lungenfische, Quastenflosser)
Amphibia
Mammalia (Säugetiere)
Testudines (Schildkröten)
Lepidosauria (Eidechsen, Schlangen)
Crocodilia (Krokodile)
Aves (Vögel)
Haare, Milchdrüsen
Schädel mit oberem und unterem Fenstra
nackte Haut, saugnapfähnliche Mundscheibe, langes Larvenstadium, 7 Paar Kiemen
Heterocercale Schwanzflosse, Placoid-Schuppen, knorpeliges Skelett
β-Keratin in der Epidermis
Ei mit extraembryonalen Membranen
paarige Gliedmaßen zur terrestrischen Lokomotion
eigentümliche Stützelemente im Skelett oder in Flossen- bzw. Beingürteln
nackte Haut mit Schleimdrüsen, akzessorische Herzen
vom Darm abgeleitete Lunge oder Schwimmblase, knochiges Endoskelett
Kiefer, 3 Paar Bogengänge, paarige Körperanhänge, Kiemenfilamente lateral zum Stützapparat der Kiemen
2 Paar Bogengänge, Wirbelkörper
abgegrenzter Kopf und dreigeteiltes Gehirn; spezialisierte Sinnesorgane; ein oder mehr Bogengangpaare, glomeruläre Niere, Neuralwulst und neurogene Epidermalplakoden
Achsenskelett lebenslang erhalten; Muskelsomiten vorhanden
Chorda dorsalis; dorsaler, hohler Nervenstrang; Schlundspalten; postanaler Schwanz; Endostyl

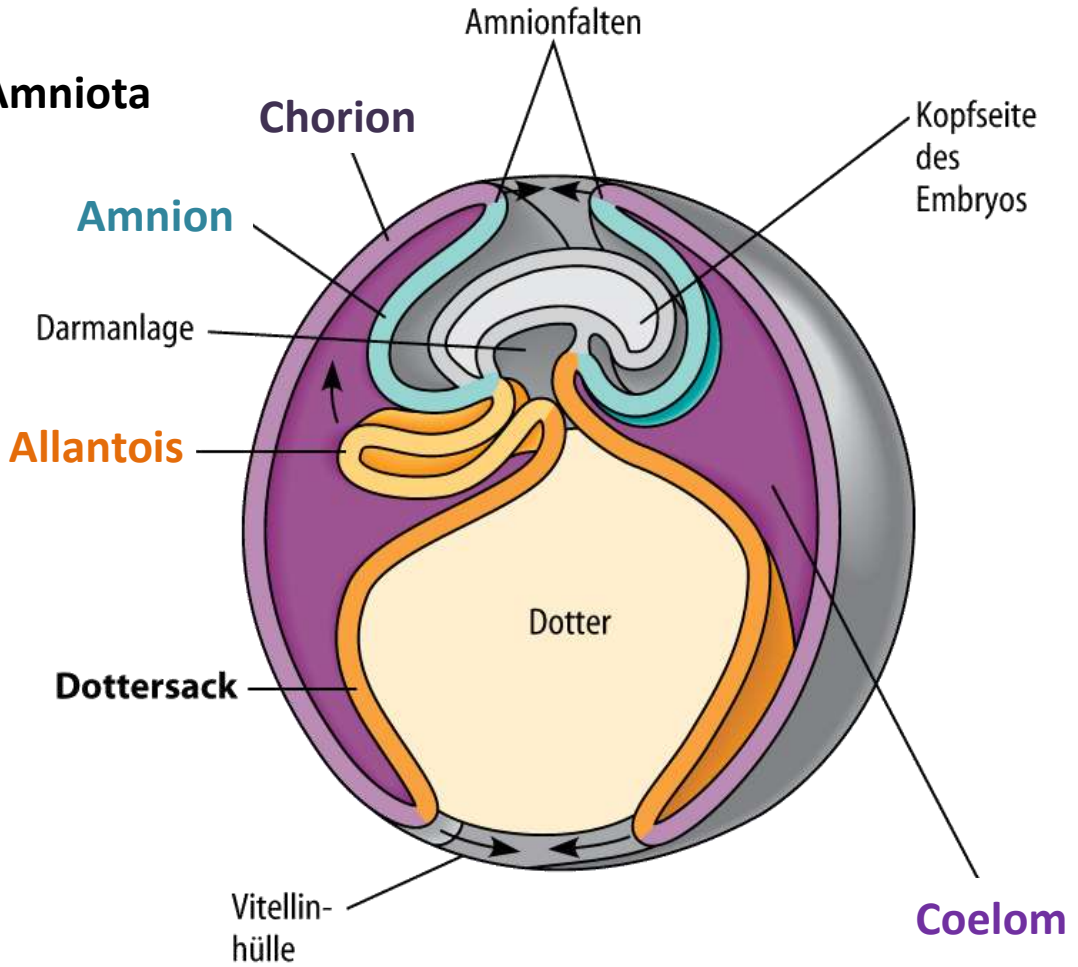
- 1866 von Ernst Haeckel für die höheren Wirbeltierklassen Reptilien, Vögel und Säugetiere in Abgrenzung zu den Anamniota (Fische und Amphibien) eingeführt.
- In der phylogenetischen Systematik sind die Amphibien die Schwestergruppe der Amnioten.

Amnioten

- Anpassung an das Landleben:
  Reptilien, Vögel + Säuger = **Amniota**

- Extraembryonale Membranen:
  - **Amnion:** Umgibt und schützt den Embryo mechanisch und vor Austrocknung
  - **Allantois:** Embryonale Harnblase; nimmt Abfallstoffe auf; bei Reptilien + Vögel auch Gasaustausch
  - extraembryonales **Coelom**
  - **Chorion:** Umschließt Embryo etc. vollständig

  - Reptilien + Vögel: schützende Eischale

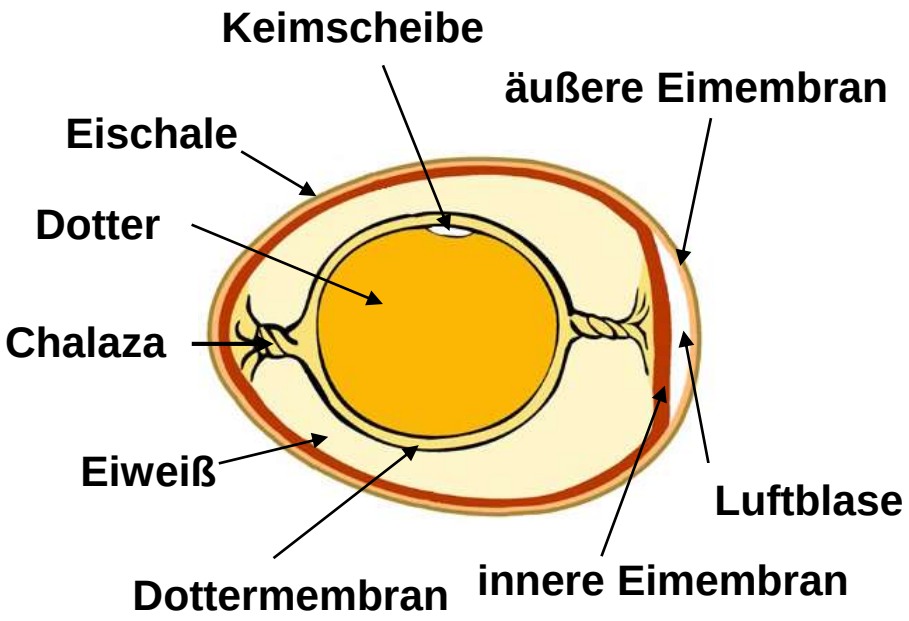


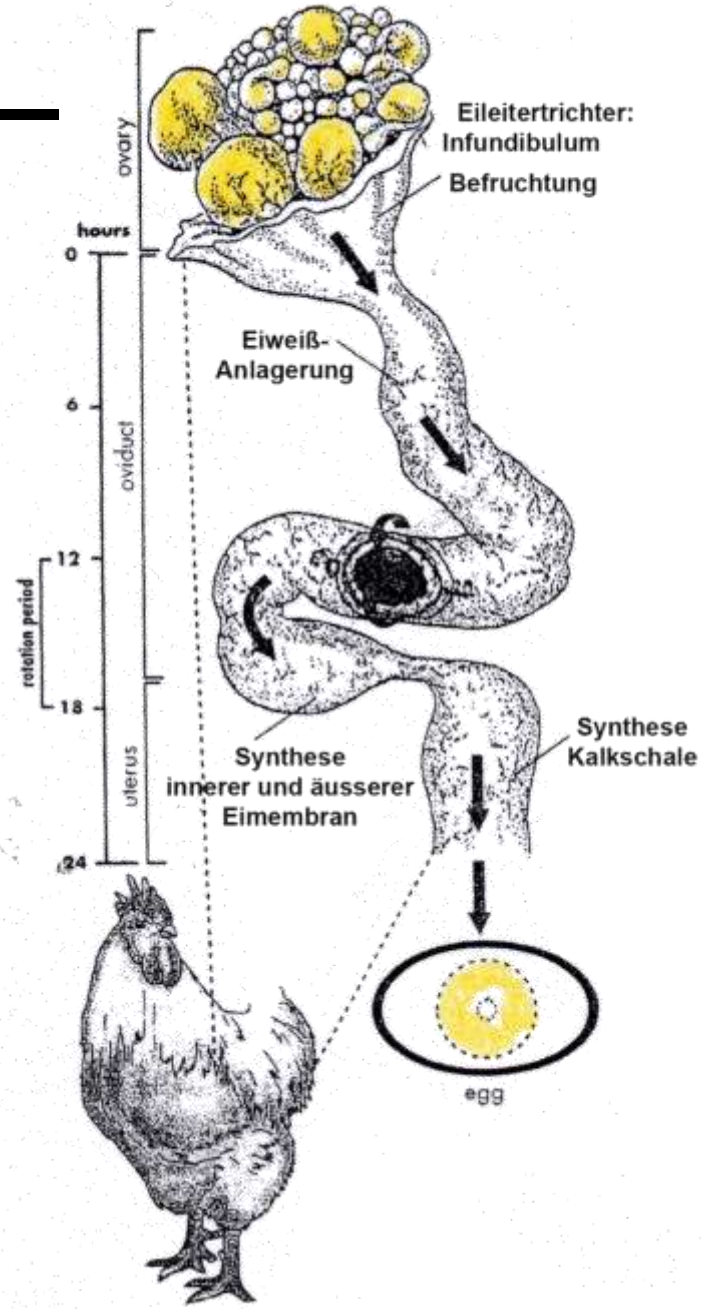
© Campbell/Reece, Biologie, 6. Aufl., 2004

Modellsystem: *Gallus gallus domesticus*

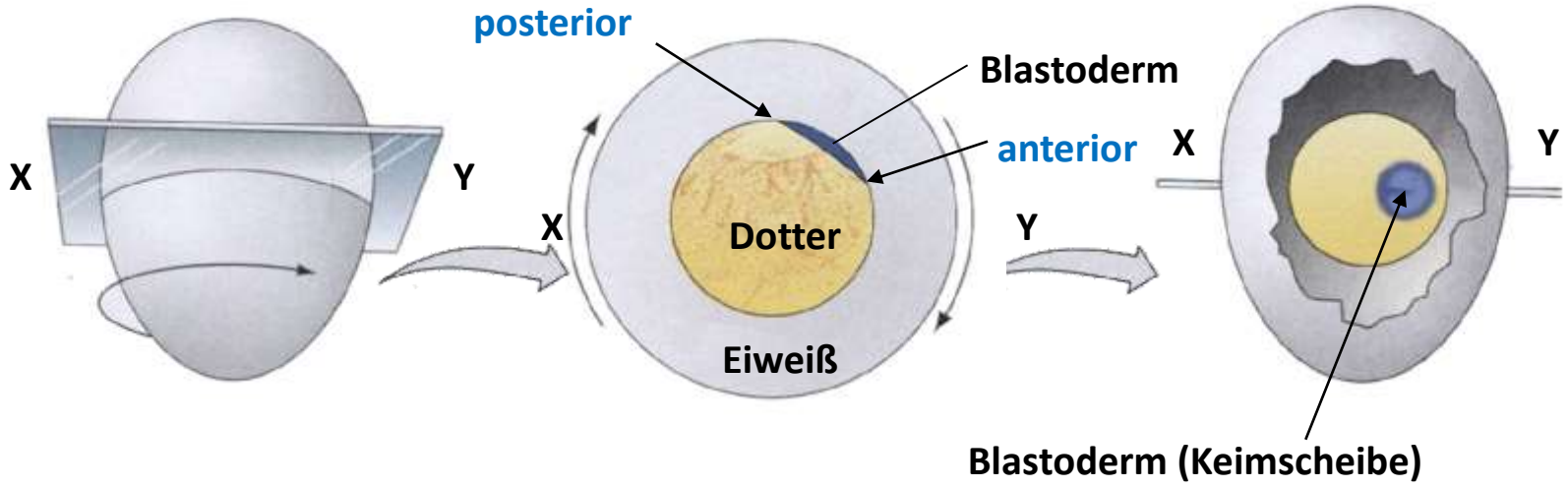
- Huhn
- altes Modellsystem (Aristoteles, Malpighi, Harvey...)
- Kücken schlüpft nach 19-21 d
- großes Ei, leichte Verfügbarkeit
- dotterreich
- meroblastische, discoidale Furchung

Ei-Entwicklung im Huhn





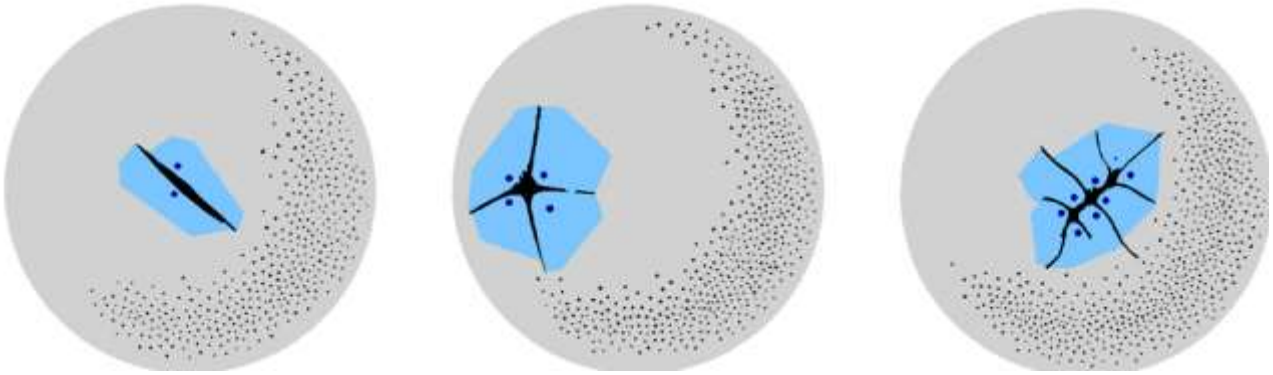
Festlegung der A/P-Achsen

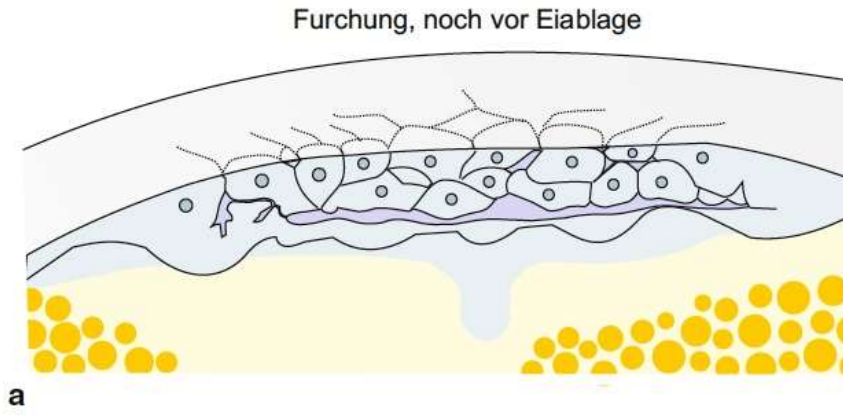


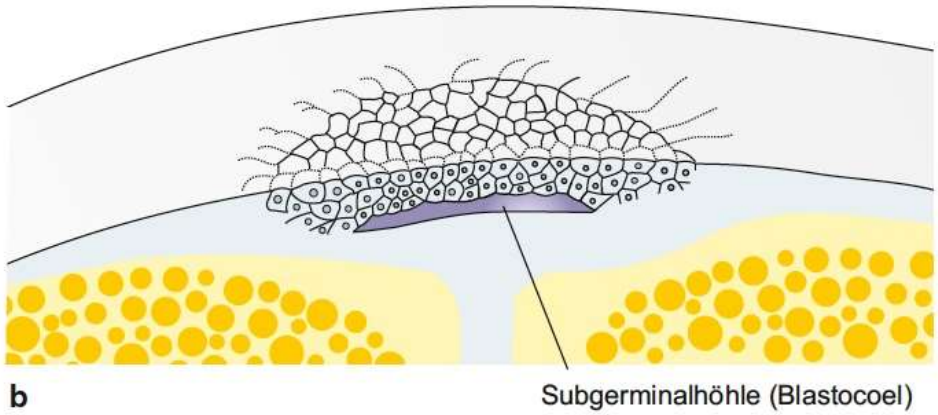
- Das Ei rotiert im Uterus 10-12 mal/Stunde; benötigt ca. 20 Stunden bis es gelegt ist.

- Festlegung der A/P-Achse durch Gravitation, da sich das dünnflüssige Albumin an der Seite der Keimscheibe ansammelt, die zum Hinterende des Embryos wird.

Discoidale Furchung im Vogelei







- Keimscheibe (Blastoderm) auf dem Dotter
- Dotter wird nicht gefurcht => azellulär
- Blastoderm hat zum Zeitpunkt der Eiablage 20.000 Zellen

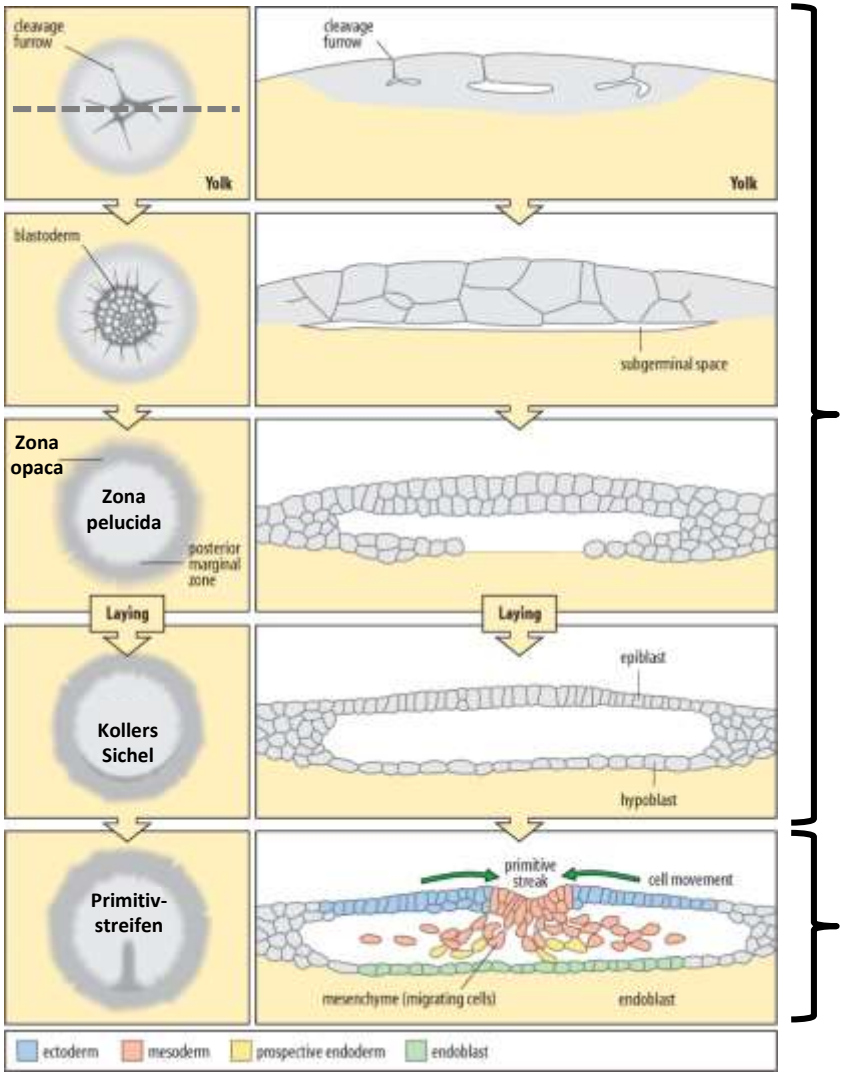
Formation der Blastula

- Die Körperachse des Hühnerembryo wird durch eine Schräglage des Embryo, hervorgerufen durch die ständige Rotation des Eis im Legekanal, und die einwirkende Gravitation festgelegt.

- Die Furchung ist discoidal, es entsteht ein scheibenförmiger Embryo.

- Die Blastula besteht aus dem Epiblasten, der den späteren Embryo bildet, und dem Hypoblasten, der später den Dottersack umgibt.

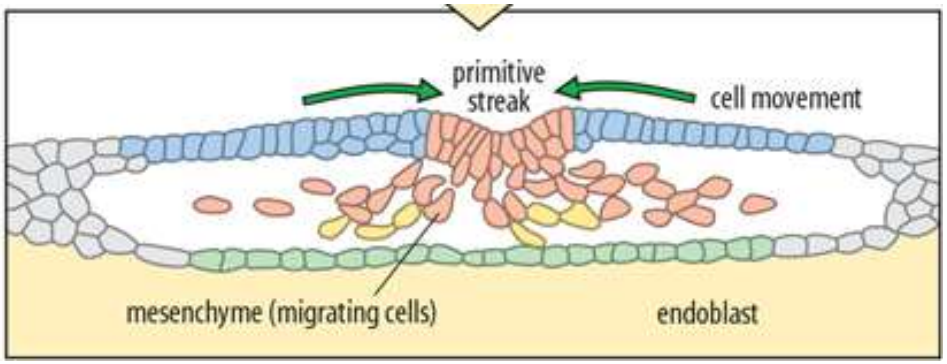
Gastrulation

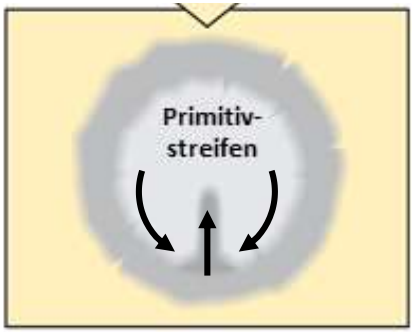


3-4 Stunden

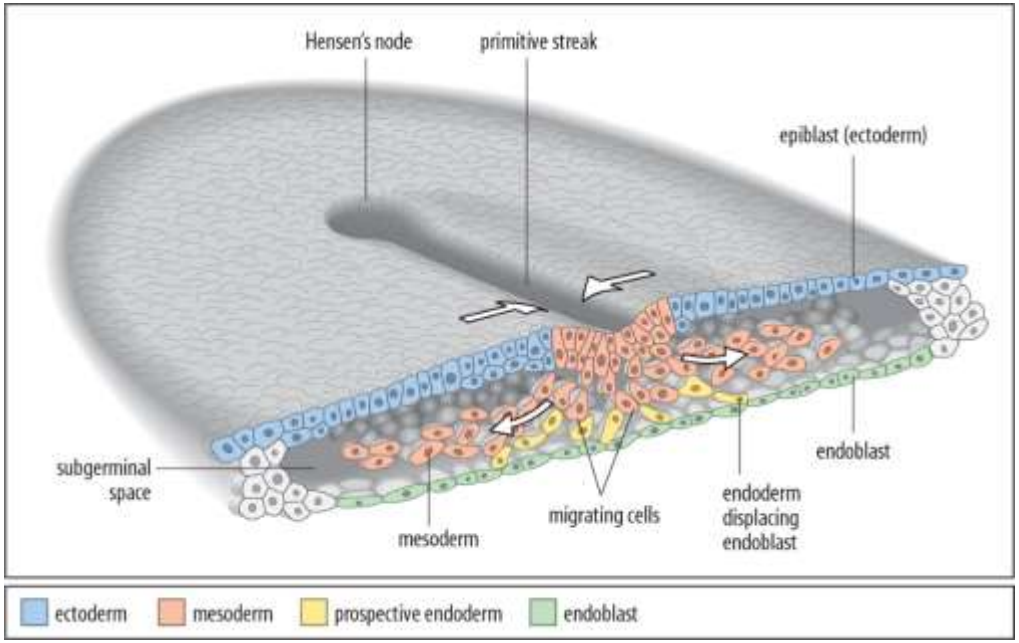
7-8 Stunden

- Primitivstreifen => Primitivrinne (Urmund)

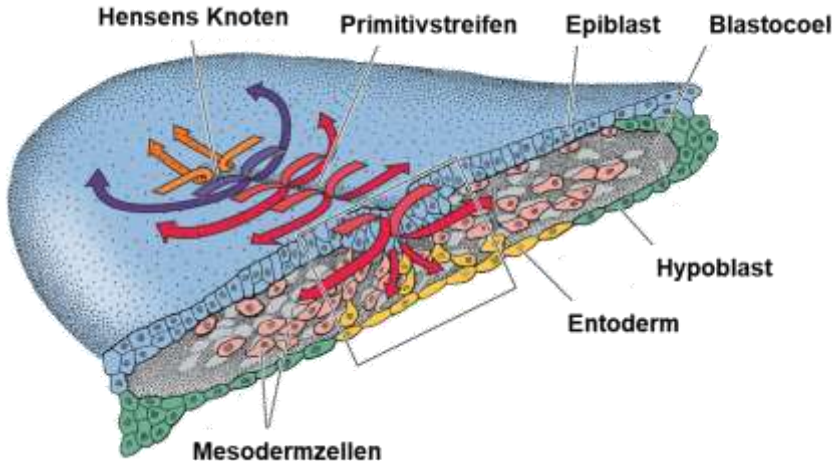




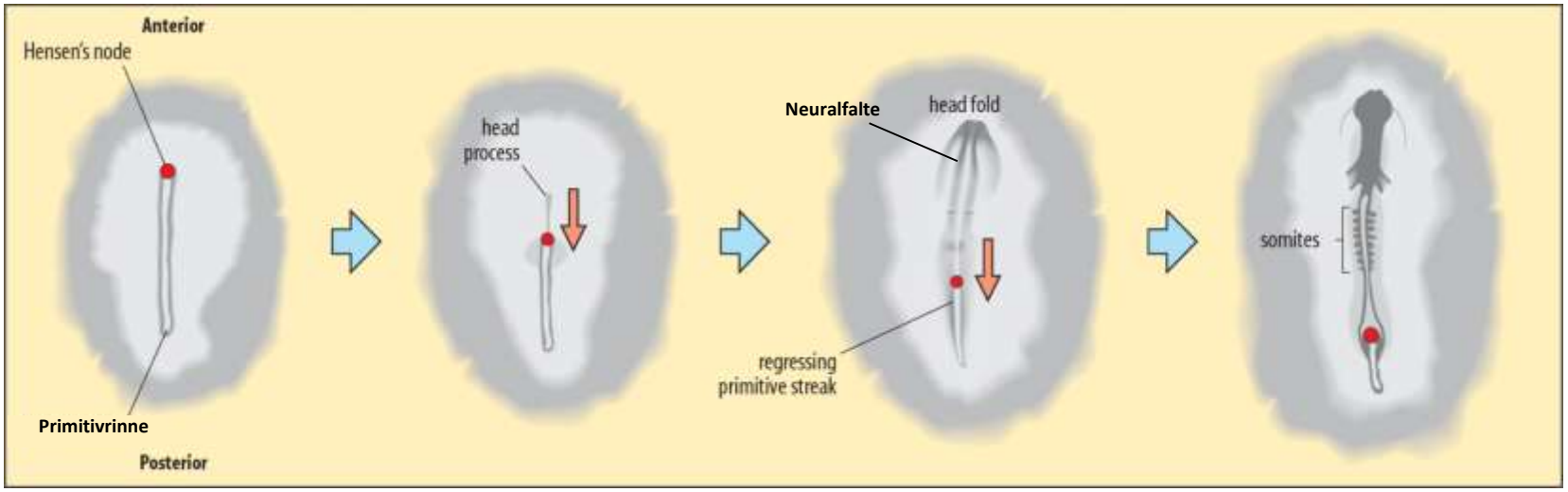
Gastrulation



- Zellen aus Epiblast wandern einzeln in Primitivrinne und 1.) verdrängen Hypoblasten und bilden Entoderm, 2.) füllen den Hohlraum zwischen Epiblasten und Hypoblasten/ Entoderm aus und bilden Mesoderm
- Zellen wandern an Hensens Knoten nach vorne



Gastrulation

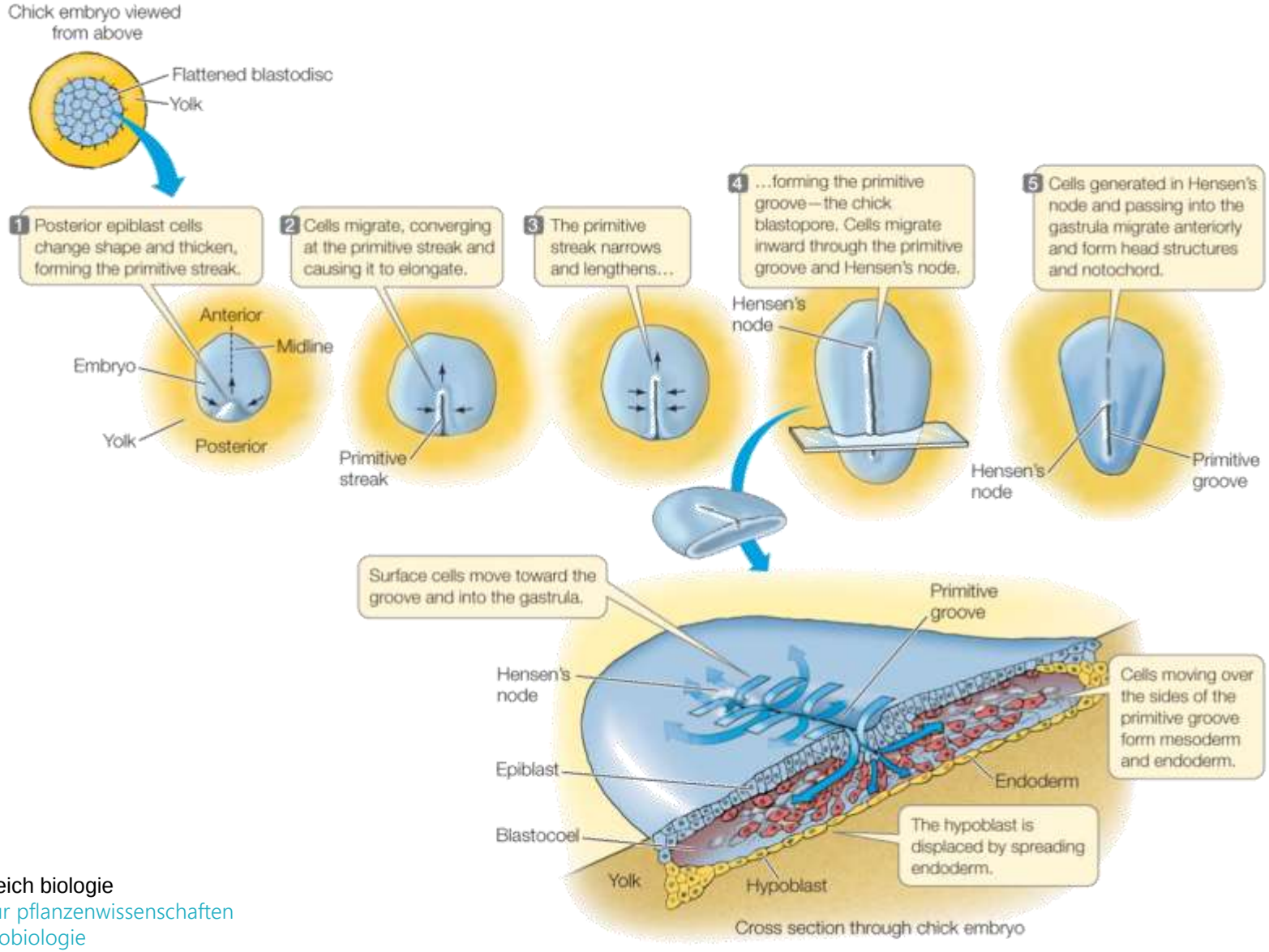


15-16 Stunden

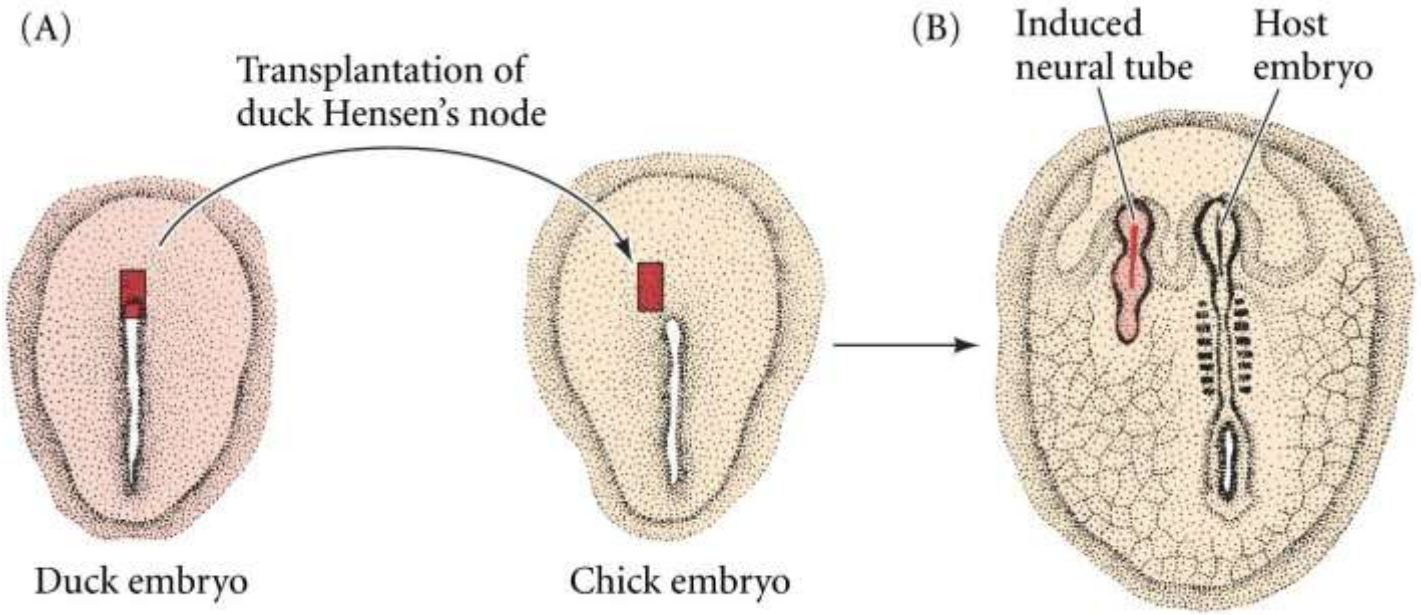
22 Stunden

- Primitivrinne = Urmund
- Hensens Knoten (Primitivknoten) = Urmundlippe (Organisator)
- zukünftig anteriore Zellen wandern zuerst in Primitivrinne (1. Entoderm des Vorderdarms, 2. Kopfmesenchym ...)
- Hensens Knoten wandert nach posterior => Ausbildung caudaler Strukturen

Gastrulation


Chick embryo viewed from above
Flattened blastodisc
Yolk
1 Posterior epiblast cells change shape and thicken, forming the primitive streak.
2 Cells migrate, converging at the primitive streak and causing it to elongate.
3 The primitive streak narrows and lengthens…
4 …forming the primitive groove—the chick blastopore. Cells migrate inward through the primitive groove and Hensen's node.
5 Cells generated in Hensen's node and passing into the gastrula migrate anteriorly and form head structures and notochord.
Anterior
Midline
Embryo
Yolk
Posterior
Primitive streak
Hensen's node
Hensen's node
Primitive groove
Surface cells move toward the groove and into the gastrula.
Primitive groove
Hensen's node
Epiblast
Blastocoel
Yolk
Hypoblast
Endoderm
Cells moving over the sides of the primitive groove form mesoderm and endoderm.
The hypoblast is displaced by spreading endoderm.
Cross section through chick embryo

Hensens Knoten



- Hensens Knoten hat induzierende Wirkung wie Urmundlippe der Amphibienblastula => Organisator
- produzieren ähnliche Signale (evolutive Konservierung!)

Rechts-Links-Achse

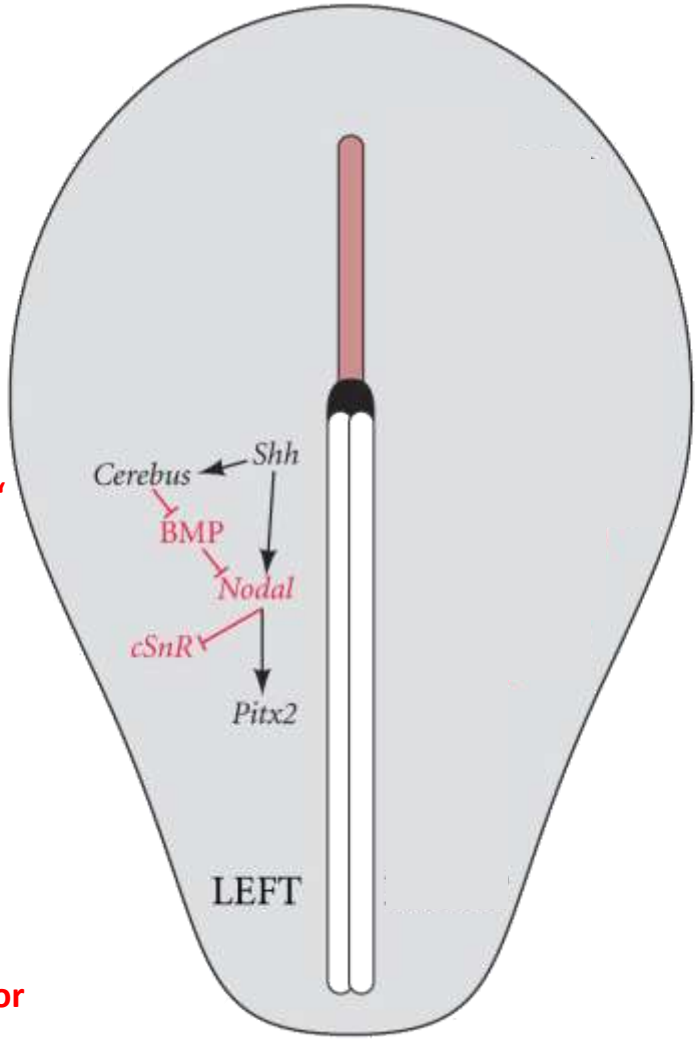
- Genauer Mechanismus unterscheidet sich bei verschiedenen Wirbeltieren.
- Hier: Hühnerembryo
- Warum Activin nur rechts exprimiert wird, bleibt unklar.

Links:
Herz, Milz

Shh
„sonic hedgehog“

Nodal

Pitx2
Transkriptionsfaktor



Rechts:
Leber

Activin
unterdrückt Ssh

Shh

Nodal

Pitx2

DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Eighth Edition, Figure 11.26 (Part 1) © 2006 Sinauer Associates, Inc.

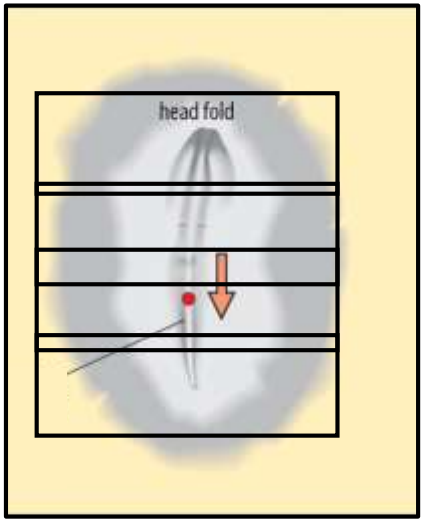
Gastrulation

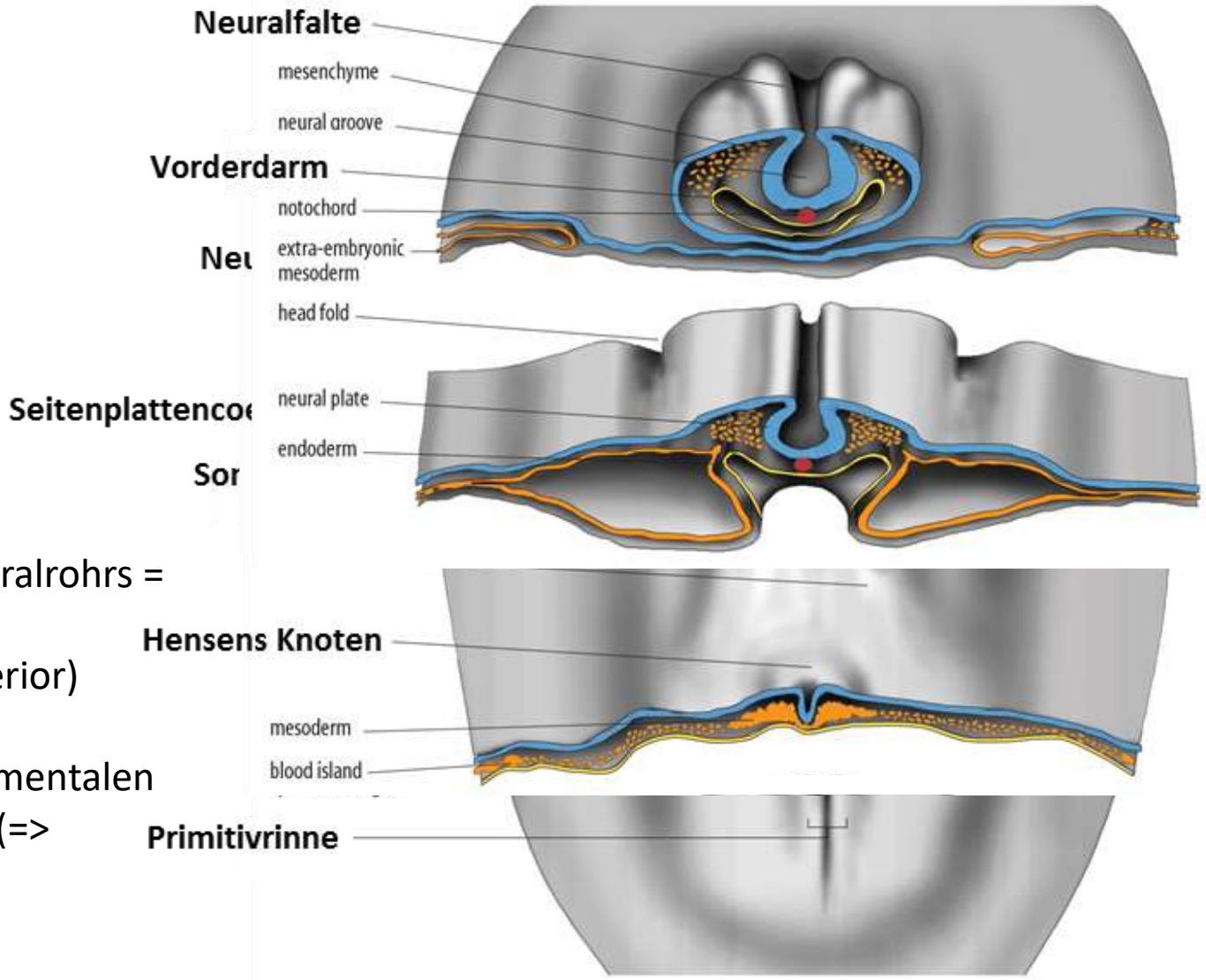
- Die Gastrulation beginnt mit der Bildung der Primitivrinne und dem Einwandern von Epiblastzellen in das Blastocoel.

- Epiblastzellen verdrängen Hypoblastzellen (werden zu Endoderm) und füllen Blastocoel (werden zu Mesoderm).

- Am Vorderende der Primitivrinne entsteht der Hensen‘sche Knoten, der die Funktion des Spemann-Organisators hat.

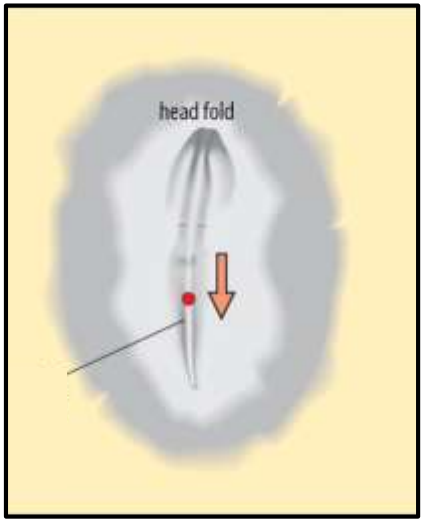
Neurulation und segmentale Gliederung des Mesoderms

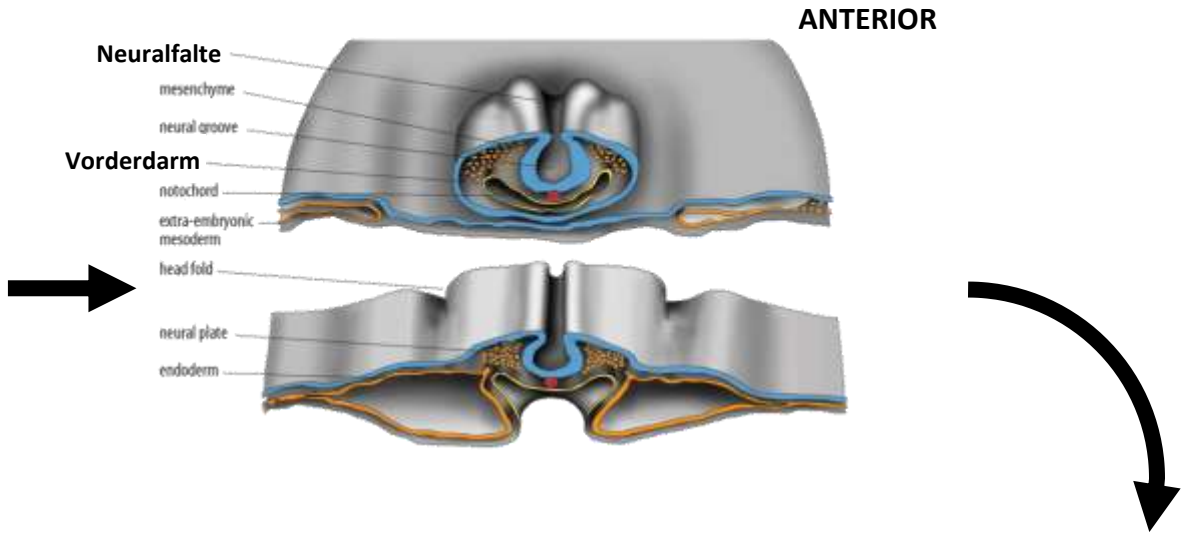


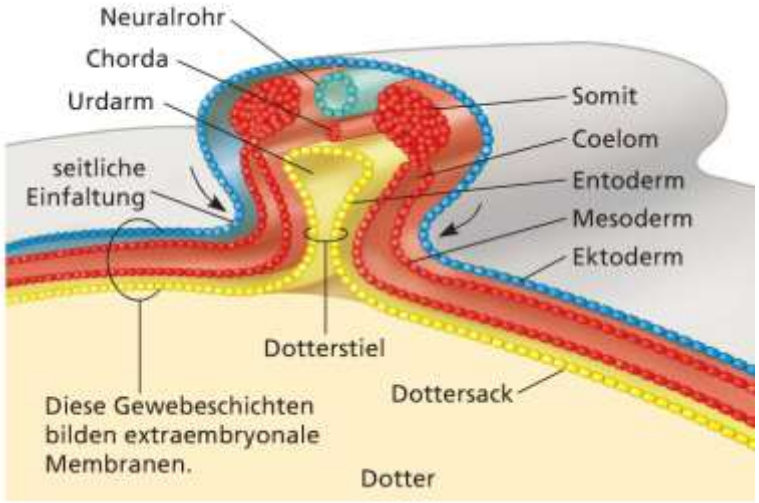


- **Neurulation:**
  Ausbildung des Neuralrohrs = Gehirns (anterior) + Rückenmarks (posterior)
- **Somiten:**
  Ausbildung von segmentalen Mesodermpaketen (=> Wirbel, Muskel)

Neurulation

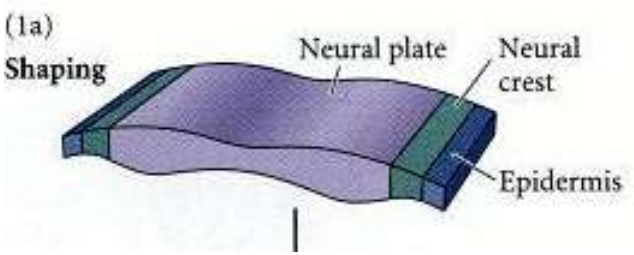






- **Ektoderm**(Epiblast) bildet Epidermis und Neuralrohr
- **Mesoderm** bildet Chorda, Somiten und Seitenplattenmesoderm (umgibt Coelom)
- **Entoderm** bildet Urdarm und Dotterstiel (Verbindung zum Dotter bleibt bestehen)

Neurulation

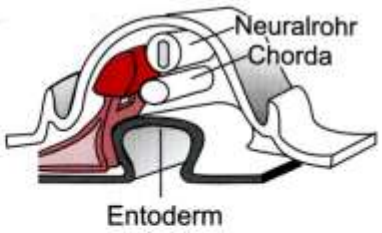


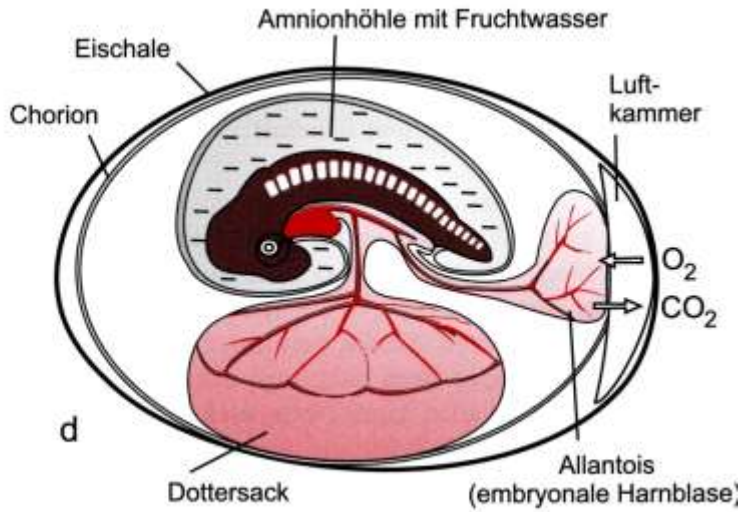
Neurulation

- Die Neurulation erfolgt entsprechend der des Frosches durch Bildung der Neuralplatte, Neuralfalten und Schließen des Neuralrohrs.

- Die segmentale Anordnung von Körperregionen und Abschnitten des ZNS entlang der Körperachse wird durch eine vielfältige Kombination von Hox-Genen reguliert.

Entwicklung des Amnions und der Allantois





Bildung von Amnion und Dottersack beim Hühnchen

- **Allantois** am Darmausgang ("Harnblase") nimmt Abfallstoffe auf und dient dem Gasaustausch

- **Amnionbildung** aus Epiblast
- **Amnionhöhle** bietet Embryo Schutz, ist mit Fruchtwasser gefüllt